

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**Modulación de la exocitosis del neurotransmisor glutamato en
terminales sinápticos de cerebro de rata: papel de la proteína
quinasa C**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Inmaculada Herrero Sastre

Director

José Sánchez-Prieto Borja

Madrid

ISBN: 978-84-8466-871-8

© María Inmaculada Herrero Sastre, 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

**MODULACION DE LA EXOCITOSIS DEL NEUROTRANSMISOR
GLUTAMATO EN TERMINACIONES SINAPTICAS DE CEREBRO DE
RATA: PAPEL DE LA PROTEINA QUINASA C.**

Memoria presentada por M^a Inmaculada Herrero Sastre
para optar al grado de Doctor
Director de la Tesis:
Dr. José Sánchez-Prieto Borja

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer ante todo a mi director, el Dr. José Sánchez-Prieto Borja, por su constante dedicación y entrega para la realización de esta tesis doctoral, así como por el interés que en todo momento mostró por mi formación.

Agradezco a la Dra. M^a Teresa Miras-Portugal, catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, por haberme acogido en este centro y por haberme facilitado la ayuda y los medios necesarios para realizar el presente trabajo.

A Enrique Castro le agradezco su paciencia conmigo y todas sus enseñanzas, en especial aquellas relacionadas con los ordenadores.

Quiero igualmente agradecer a las profesoras Dolores Fideu Alonso, Esmerilda García Delicado y Magdalena Torres Molina por la acogida que me brindaron en este Departamento y por su constante apoyo y dedicación.

Quiero dar las gracias a mis compañeros Raquel, Tere, Elena, Suso, Fernando y Jesús, que siempre han estado compartiendo conmigo mis alegrías y mis penas, así como a M^a Jesús, M^a Carmen y Mariano por todo lo que han hecho por mí.

Para la realización de esta tesis doctoral he contado con una beca de la Universidad Complutense de Madrid.

A Fernando
A mis padres

ABREVIATURAS

AA	Acido araquidónico.
(1R,3S)ACPD	Acido (1R, 3S) amino ciclopentil dicarboxílico.
(1S,3R)ACPD	Acido (1S, 3R) amino ciclopentil dicarboxílico.
ADP	Adenosina 5'-bifosfato.
AMPA	α -amino-3hidroxi-5metilisoxazoil-4propionato.
AMP _c	Adenosina 5' monofosfato cíclico.
4AP	4-aminopiridina.
L-AP3	Acido 2-amino-3 fosfopropiónico.
L-AP4	Acido 2-amino-3 fosfobutírico.
AP5	Acido 2-amino-5 fosfopentanoíco.
ATP	Adenosina 5'-trifosfato.
BSA	Albúmina de suero bovino.
[Ca ²⁺] _{cit}	Concentración citosólica de Ca ²⁺ .
Ca	Curio.
w-CgTx	w-conotoxina.
CNQX	6 ciano-7-nitroquinoxalin-2,3 diona.
cols.	colaboradores.
DAG	Diacilglicerol.
DisC ₂ (5)	Ioduro de 3',3' dietil-tio-carbociamida.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EC ₅₀	Concentración a la que se obtiene el 50% de estimulación máxima.
EDTA	Acido etilendiamino tetracético.
EGTA	Acido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter)N,N' tetracético.
Fura 2-AM	Fura-2-penta(acetoximetil)ester.
GABA	Acido g-amino butírico.
HEPES	Acido 4-(2hidroxietil)1-piperazin-etil-sulfónico.
12-HETE	Acido 12-s-hidroxi-eicosatetranoico.
12-HPETE	Acido 12-s-hidroperoxi-eicosatetranoico.
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato.
LDH	Láctico deshidrogenasa.
MAA	Metil araquidonato.

MK-801	Maleato de (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] ciclohepten-5,10-imina.
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina, forma reducida,
NADP	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato, forma oxidada.
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato, forma reducida.
NMDA	N-metil-D-aspártico.
4 β -PDBu	4- β -forbol 12,13 dibutirato.
4 α -PDD	4- α -forbol 12,13 dibutirato.
Pipes	Acido 1,4-piperazin-dietil-sulfónico.
PKC	Proteína quinasa C.
PKM	Proteína quinasa M.
PMA	Forbol 12,13 miristoil acetato.
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SEM	Desviación estandar.
TCA	Acido tricloroacético.
TEA	Tetraetilamonio.
TES	Acido 2-([2 hidroxil-1,1 bis (hidroximetil) etil] amino) etano sulfónico.

INDICE

	pag
INTRODUCCION.	1
1. Liberación de neurotransmisores.	3
1.1. Generalidades.	3
1.2. Bases moleculares de la exocitosis.	6
1.2.1. Movilización de vesículas.	7
1.2.2. Colocación de la vesículas en la zona activa y fusión.	8
2. El ácido glutámico como neurotransmisor.	11
2.1. Generalidades.	11
2.2. Localización de las sinapsis glutamatérgicas.	12
2.3. Organización presináptica de la sinapsis glutamatérgicas.	14
2.3.1. Transportador de glutamato en la membrana plasmática.	14
2.3.2. Transporte de glutamato en vesículas sinápticas.	16
2.3.3. Liberación y exocitosis de glutamato.	17
2.3.4. Receptores de glutamato.	20
2.3.4.1. Receptor de NMDA.	20
2.3.4.2. Receptor de AMPA-kainato.	21
2.3.4.3. Receptores metabotrópicos.	22
3. El sinaptosoma como modelo de sinapsis "in vitro".	26
3.1. Métodos empleados para la liberación de neurotransmisores.	28
4. Modulación de la liberación de glutamato.	30
4.1. Receptores presinápticos.	30
4.2. Proteína quinasa C.	33
4.3. Fosfoproteínas implicadas en la liberación de neurotransmisores.	35
4.4. Acido araquidónico.	38
OBJETIVOS.	40
MATERIALES Y METODOS.	41
1. MATERIAL.	42
1.1. Reactivos y productos químicos.	42
1.2. Aparatos.	43
1.3. Material biológico.	44
2. METODOS.	44
2.1. Obtención de sinaptosomas.	44
2.1.1. Gradiente de Ficoll.	44
2.1.2. Gradiente de Percoll.	45
2.2. Determinación de la liberación de glutamato.	47
2.3. Determinación del glutamato extrasinaptosomal.	48

2.4. Determinación de la concentración intracelular de Ca^{2+} libre.	49
2.5. Determinación del potencial de membrana.	51
2.6. Determinación de la actividad de la proteína quinasa C.	52
2.7. Efectos del pretratamiento de los sinaptosomas con ésteres de forbol en la actividad de la proteína quinasa C.	53
2.8. Determinación de diacilglicerol.	54
2.9. Determinación de la actividad del enzima láctico deshidrogenasa.	55
2.10. Determinación de los nucleótidos ATP y ADP.	56
2.11. Determinación de proteínas.	57
RESULTADOS.	58
1. Parámetros de la liberación de glutamato en terminaciones sinápticas de corteza cerebral.	59
2. La activación de la proteína quinasa C aumenta la liberación de glutamato.	60
3. Influencia de la albúmina de suero bovino, BSA, en las acciones de los ácidos grasos endógenos sobre la liberación de glutamato.	64
4. Caracterización de la inhibición de la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} , por ácido araquidónico.	70
4.1. Curva dosis-respuesta.	70
4.2. Efecto detergente de concentraciones altas de ácido araquidónico.	70
4.3. Mecanismo de la inhibición por el ácido araquidónico de la liberación de glutamato.	73
4.4. La acción inhibidora de ácido araquidónico en la liberación de glutamato es independiente de la activación de la proteína quinasa C.	78
4.5 Persistencia a la acción inhibidora del ácido araquidónico en presencia de inhibidores del metabolismo del ácido graso.	85
4.6 Efecto del ácido araquidónico en la concentración extrasinaptosomal de glutamato.	87
5. Activación sinérgica de la proteína quinasa C: efectos en la liberación de glutamato.	89
6. Un receptor metabotrópico de glutamato facilita la liberación de glutamato.	95
6.1. Caracterización farmacológica.	96
6.2. Papel del ácido araquidónico en la facilitación de la liberación de glutamato por el receptor metabotrópico.	99
6.3. Mecanismo de potenciación de la liberación de glutamato por el receptor metabotrópico.	101
6.4. El receptor metabotrópico está acoplado a la generación de diacilglicerol.	103
6.5. Desensibilización del receptor metabotrópico: implicación de la proteína quinasa C.	107

6.6. Movilización de Ca^{2+} intrasinaptosomal por el agonista del receptor metabotrópico (1S,3R)ACPD.	110
DISCUSION.	113
1. La proteína quinasa C potencia la exocitosis de glutamato a través de la inhibición de un canal de K^+ con características similares al rectificador retrasado.	114
2. El ácido araquidónico inhibe la exocitosis de glutamato por un mecanismo independiente de la proteína quinasa C.	117
3. Activación sinérgica de la proteína quinasa C, papel de los ácidos grasos insaturados.	120
4. Receptor metabotrópico de glutamato presináptico acoplado a la activación de la proteína quinasa C.	121
5. Posibles implicaciones del receptor metabotrópico facilitador en la exocitosis de glutamato.	127
CONCLUSIONES.	130
BIBLIOGRAFIA.	132

INTRODUCCION

El ácido glutámico es el neurotransmisor excitatorio más utilizado por las neuronas del Sistema Nervioso Central. Las sinapsis glutamatérgicas están implicadas en la transmisión sináptica rápida, en los procesos de aprendizaje y memoria, en los fenómenos de plasticidad neuronal, así como en diversas neuropatologías, tanto de aparición aguda, como pueden ser las derivadas de las situaciones de hipoglucemia, hipoxia, e isquemia cerebrales, como en situaciones neurodegenerativas crónicas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y de Huntington. En los últimos años se han realizado importantes avances en el conocimiento de las sinapsis glutamatérgicas. A nivel postsináptico, se han obtenido importantes datos moleculares sobre los receptores de glutamato que median las acciones antes mencionadas lo que junto a los estudios farmacológicos y electrofisiológicos ha permitido la caracterización de numerosos subtipos y variantes los distintos receptores operados por este neurotransmisor.

A nivel presináptico, se ha caracterizado una vía de exocitosis para la liberación de glutamato que está fuertemente acoplada a la entrada de Ca^{2+} . Así mismo, se ha conseguido identificar, purificar y clonar una serie de proteínas de las vesículas sinápticas y de la membrana plasmática, que son posibles candidatos a jugar un papel directo en el proceso de exocitosis. Sin embargo, existe un gran desconocimiento de los canales iónicos presinápticos que operan en las sinapsis centrales, lo que es debido, en parte, al hecho de que las terminaciones sinápticas, por su pequeño tamaño, no son accesibles a los estudios electrofisiológicos de grapado de membrana "patch clamp". En este sentido, hay que señalar que no se ha podido identificar aún de manera inequívoca el canal de Ca^{2+} sensible a voltaje que controla la exocitosis de glutamato. Por otro lado, se conoce muy poco sobre los mecanismos presinápticos que controlan la liberación de glutamato. La identificación de receptores presinápticos de tipo autoreceptor, receptores que responden al neurotransmisor liberado, así como de heteroreceptores, los que responden a una sustancia distinta de glutamato, permitiría el estudio de los mecanismos de control de la liberación de glutamato y que serían a su vez moduladores de la función sináptica glutamatérgica. Al mismo tiempo, la identificación de estos receptores presinápticos abriría una vía de acción farmacológica para el control de estas sinapsis.

En esta tesis doctoral se ha utilizado la preparación de las terminaciones sinápticas, conocidas también como sinaptosomas, para estudiar la regulación de la

liberación de glutamato. Aunque se han utilizado un gran número de preparaciones no nerviosas para estudiar la exocitosis, como células cromafines o mastocitos, sin embargo, hay que señalar que la exocitosis en estos sistemas es diferente, ya que tiene lugar en una escala de segundos, mientras que la liberación de glutamato se produce en milisegundos. Por otro lado, el valor de preparaciones de tejido nervioso relativamente intactas, como los cortes de cerebro o los cultivos de neuronas, es también limitado debido a la proporción relativamente pequeña del volumen ocupado por las terminaciones sinápticas en la mayor parte de las regiones cerebrales. Además, en estas preparaciones es difícil eliminar la participación glial. Sin embargo, la preparación de sinaptosomas permite una mejor interpretación de los resultados obtenidos ya que carece de cualquier tipo de interferencias o contaminación por elementos postsinápticos. En esta tesis doctoral se han utilizado las terminaciones sinápticas de corteza cerebral de rata para investigar los mecanismos que controlan la liberación de glutamato, con el fin de identificar las señales extracelulares que a través de receptores presinápticos podrían establecer un tono modulador en las sinapsis glutamatérgicas.

1. LIBERACION DE NEUROTRANSMISORES.

1.1. Generalidades.

El proceso de secreción está constituido por la fusión de la membrana de la vesícula secretora con la membrana plasmática. La secreción puede ser constitutiva, si su fin es la renovación de diversas proteínas de membrana, ó estimulada, como en el caso de la liberación de neurotransmisores. La exocitosis constitutiva tiene lugar en casi todos los tipos celulares: linfocitos, hepatocitos y levaduras (Kelly 1985, Rothman y cols. 1989), mientras que la exocitosis estimulada está limitada a las neuronas, células endocrinas y exocrinas, mastocitos y plaquetas (Kelly, 1985, Rothman y cols. 1989). Es difícil hacer una extrapolación de los diferentes sistemas secretores mencionados. Así, los mastocitos y las plaquetas secretan su contenido vesicular en cualquier parte de la membrana plasmática, mientras que en las neuronas esto tiene lugar en zonas especializadas de la terminación sináptica denominadas zonas activas (Kelly 1985). Además, en los mastocitos y plaquetas la liberación del contenido de sus gránulos secretores tiene lugar en una escala de tiempo que es de varios órdenes de magnitud mayor que la liberación rápida de neurotransmisores de muchas sinapsis del Sistema Nervioso Central. En la exocitosis estimulada es

necesaria una señal específica que permita la aproximación de la vesícula al sitio de liberación en la membrana plasmática y que dispare la fusión. En la neurona intacta esta señal empieza como un potencial de acción que se propaga a lo largo del axón, provocando en la terminación sináptica la apertura de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, lo que a su vez facilita la entrada de Ca^{2+} e inicia la liberación de neurotransmisor (Kuffler y cols. 1984).

Las sustancias activas en el Sistema Nervioso Central se pueden agrupar de acuerdo con su abundancia relativa. En un primer grupo podríamos considerar los aminoácidos neurotransmisores glutamato, aspartato, ácido γ -aminobutírico (GABA) y glicina. Estos aminoácidos están presentes en el cerebro a concentraciones del orden de $\mu\text{moles/g}$ de tejido y se acumulan en vesículas sinápticas pequeñas (SSV). Estos aminoácidos son considerados como neurotransmisores de "acción rápida", un concepto que refleja tanto la velocidad de su mecanismo de liberación como sus acciones en los receptores postsinápticos (Fonnum 1984, Engelsen 1986, Mayer y Westbrook 1987).

Un segundo grupo de neurotransmisores comprende las catecolaminas (dopamina, adrenalina, noradrenalina y 5-hidroxitriptamina), purinas y acetilcolina (Smith 1989). A pesar de ser menos abundantes en el Sistema Nervioso Central (nmoles/g de tejido), el papel neurotransmisor de estas sustancias es más fácil de estudiar porque están concentradas en vesículas (Knight y Baker 1982), en contraste con la alta concentración citoplásmica que existe de los aminoácidos neurotransmisores. Aunque algunos de estos neurotransmisores son de acción lenta, la nicotina también abre rápidamente canales iónicos. Algunos neurotransmisores de este grupo, como es el caso de la noradrenalina son acumulados presinápticamente en vesículas sinápticas pequeñas y en vesículas sinápticas grandes y densas (Thureson-Klein y Klein 1990), hecho que puede determinar diferencias en cuanto a la velocidad de liberación de este neurotransmisor.

El tercer grupo de sustancias neurotransmisoras está constituido por los péptidos. Son menos abundantes pmoles/g de tejido y se acumulan en vesículas sinápticas grandes y densas (Thureson-Klein y Klein 1990, Zhu y cols. 1986). Los péptidos en muchos casos están implicados en la modulación a largo plazo de las acciones de otros neurotransmisores (Thureson-Klein y Klein 1990) y son de acción lenta. Esto es debido a que tanto su liberación como la respuesta sináptica son más

lentas. Además sus acciones no son inactivadas dentro de la escala temporal de los neurotransmisores clásicos. De hecho, muchas veces las acciones de los péptidos no son localizadas como la de los neurotransmisores clásicos, sino que pueden ser distribuidos por el sistema vascular como en el caso de las hormonas.

En términos generales, la liberación de neurotransmisores es iniciada por la elevación de la concentración de Ca^{2+} en la neurona que sigue a la señal despolarizante que abre los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Así mismo, se puede considerar a grandes rasgos dos mecanismos diferentes de liberación, por un lado, la liberación de aminoácidos y de otros neurotransmisores acumulados en vesículas sinápticas pequeñas y por otro lado, la liberación de péptidos neurotransmisores acumulados en vesículas sinápticas grandes y densas. Estos dos tipos de vesículas difieren en características morfológicas tales como el tamaño ó la densidad en el microscopio electrónico. Los diferentes mecanismos de liberación se ponen también de manifiesto porque determinados estímulos son capaces de liberar selectivamente un tipo de vesículas. Así en la unión neuromuscular, se ha observado que la α -latrotoxina estimula la deplección de las vesículas sinápticas pequeñas pero no la de las vesículas sinápticas grandes y densas (Matteoli y cols. 1988). Por otro lado, la estimulación de baja frecuencia induce la liberación de neurotransmisores no peptídicos, mientras que la estimulación de alta frecuencia, libera todo tipo de neurotransmisores (Bartfai y cols. 1988). Esta diferencia en el mecanismo de liberación también se pone de manifiesto en la localización de las vesículas: mientras que las vesículas sinápticas grandes y densas, liberan su contenido en áreas no especializadas desde el punto de vista estructural de las terminaciones nerviosas y ocasionalmente de las dendritas, las vesículas sinápticas pequeñas son normalmente liberadas en áreas localizadas de las terminaciones sinápticas denominadas zonas activas (Trimble y Scheller 1988).

En los siguientes apartados en los que trataremos de aspectos moleculares básicos de la exocitosis nos referiremos salvo, que se exprese lo contrario, a la exocitosis de vesículas sinápticas pequeñas que media la liberación de los neurotransmisores de acción rápida como el glutamato.

1.2 Bases moleculares de la exocitosis.

Dadas las numerosas diferencias existentes entre la exocitosis neuronal y la secreción en otros tipos celulares, parece razonable que estas diferencias se reflejen también en las propiedades de las proteínas implicadas. Así, se sabe, que la exocitosis en las sinapsis centrales es muy rápida, con un tiempo de retraso entre la entrada de Ca^{2+} y la respuesta postsináptica, de sólo unas centésimas de microsegundo, mientras que en otros sistemas secretores este retraso es varios órdenes de magnitud mayor (Smith y Augustine 1988, Almers y Tse 1990), lo que sugiere que la maquinaria exocitótica en las sinapsis centrales rápidas tiene que estar localizada cerca de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de la membrana presináptica.

Está generalmente aceptado que las vesículas sinápticas se colocan ó "atracan" en una zona especializada de la membrana presináptica denominada zona activa, que seguramente contiene agrupamientos de los canales de Ca^{2+} (Smith y Augustine 1988). Esta disposición de los canales permite la formación de microdominios de una concentración elevada de Ca^{2+} después de la estimulación (Fogelson y Zucker 1985, Simon y Llinás 1985). Debido a esta alta concentración de Ca^{2+} , el receptor de Ca^{2+} de la maquinaria exocitótica podría exhibir una baja afinidad por el Ca^{2+} (Smith y Augustine 1988). Además, el receptor de Ca^{2+} une más de una molécula de Ca^{2+} para su activación total (Augustine y cols. 1991). La alta velocidad de la liberación sináptica implica, a nivel molecular, que el Ca^{2+} está acoplado a la exocitosis por un cambio conformacional de proteínas previamente ensambladas, ya que el tiempo de retraso al que nos hemos referido antes, es demasiado corto para permitir cualquier etapa de amplificación enzimática (Südhof y Jahn 1991).

En experimentos de registro de capacitancia durante la exocitosis se observa la aparición transitoria y reversible de un poro, que tiene la conductancia de un gran canal iónico (Monck y Fernández 1992). La formación transitoria de este poro de fusión se ha observado en muchas células secretoras y se piensa que es un fenómeno común en la fusión de las membranas biológicas que tienen lugar durante la exocitosis.

Las proteínas de membrana de las vesículas que experimentan exocitosis tienen un papel clave en los acontecimientos moleculares que tienen lugar en la función secretora. Por ello, a continuación exponemos algunas ideas sobre posibles funciones

de las proteínas de membrana de las vesículas sinápticas.

1.2.1. Movilización de vesículas.

En determinadas condiciones experimentales sólo una pequeña población de vesículas sinápticas participan en la exocitosis y en su reciclamiento posterior, mientras que la mayor parte de las vesículas se mantienen en reserva en la terminación sináptica. La facilitación de la liberación que se observa durante la estimulación repetitiva podría ser debida, en cambio, a una movilización de la población de reserva. Las vesículas sinápticas están suspendidas en una red de filamentos formada por espectrina y actina (Landis y cols. 1988, Hirokawa y cols. 1989) y la movilización de las vesículas implica la liberación de estas formaciones reticulares.

Las sinapsinas son los candidatos para la regulación de la liberación de vesículas de esta trama reticular. Estas proteínas son una familia de cuatro proteínas homólogas (sinapsina Ia, Ib, IIa y IIb (Südhof y cols. 1989). La sinapsina Ia está unida a vesículas e interacciona también con la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CAM-quinasa II) (Benfenati y cols. 1992). Estudios in vitro han demostrado que la sinapsina Ia se une también a espectrina y actina (Valtorta y cols. 1992). La unión de sinapsina a vesículas sinápticas y a los filamentos de actina se debilita por fosforilación de la sinapsina con la CAM-quinasa II (Valtorta y cols. 1992). El grupo de Greengard propone que la sinapsina Ia forma uniones entre la membrana vesicular y la matriz celular de actina y que su fosforilación por elevación en la concentración intracelular de Ca^{2+} y estimulación de la CAM-quinasa II da lugar a la liberación de las vesículas de la red del citoesqueleto y a la transferencia de las mismas desde el compartimiento de reserva al compartimiento activo (Valtorta y cols. 1992).

Sin embargo, en un trabajo más reciente, Betz y Bewick han cuestionado el concepto de una población de vesículas sinápticas activas y otra de reserva (Betz y Bewick 1992). Estos autores han monitorizado de una manera directa el reciclamiento de las vesículas en la unión neuromuscular con colorantes lipofílicos que marcan las vesículas que experimentan endocitosis demostrando que las vesículas que se reciclan se mezclan al azar con la población de vesículas existentes y experimentan una nueva exocitosis también al azar, sin que exista evidencias de una preferencia por la población de reciclamiento.

1.2.2. Colocación de las vesículas en la zona activa y fusión.

La colocación de las vesículas sinápticas en la membrana plasmática incluye el reconocimiento de la diana correspondiente en la membrana y el establecimiento de una unión fuerte con dicha diana. No está bien definido si las proteínas implicadas en esta colocación de las vesículas en la zona activa son las mismas que catalizan la fusión con la membrana ó si los dos procesos son realizados por proteínas distintas. Entre las proteínas que pudieran jugar un papel importante en dichos procesos hay que considerar, la sinaptotagmina, la sinaptofisina y la sinaptobrevina.

La sinaptotagmina es una familia de proteínas de la membrana de las vesículas sinápticas (Matthew y cols. 1981) que posee dos copias de una secuencia con homología al dominio regulador de la proteína quinasa C (C_2) en la región carboxílica terminal (Südhof y Jahn 1991). El dominio C_2 de la proteína quinasa es capaz de unir Ca^{2+} y fosfolípidos formando un complejo terciario (Nishizuka 1992). Esta homología ha llevado a proponer que la sinaptotagmina puede también interaccionar con Ca^{2+} y fosfolípidos, y de hecho, se ha demostrado que la sinaptotagmina une Ca^{2+} con una K_d de 10^{-6} y 10^{-7} y que esta unión depende estrictamente de fosfolípidos cargados negativamente. Por otro lado, el hallazgo de que la sinaptotagmina forma tetrámeros y que cada monómero une más de un ión Ca^{2+} significa que esta proteína cumple el criterio de poseer más de un sitio de unión de Ca^{2+} , que es uno de los requerimientos del receptor de Ca^{2+} de la exocitosis (Brose y cols. 1992).

La sinaptotagmina se une al receptor de la α -latrotoxina, el componente activo del veneno de la araña "viuda negra" causando la liberación masiva de neurotransmisor independiente de Ca^{2+} (Rosenthal y Meldonesi 1989). El estudio de este receptor ha llevado al descubrimiento de las neurexinas, una familia de proteínas de la superficie celular que interacciona específicamente con la sinaptotagmina (Hata y cols. 1993).

La sinaptotagmina interacciona también con los sitios de unión de Ca^{2+} de la ω -conotoxina (Yoshida y cols. 1992). Esta interacción está mediada por la syntaxina, otra proteína de la membrana presináptica (Bennet y cols. 1992) y se ha interpretado como una evidencia de la interacción directa de sinaptotagmina con los canales de Ca^{2+} presinápticos. Sin embargo, trabajos recientes demuestran que la liberación por

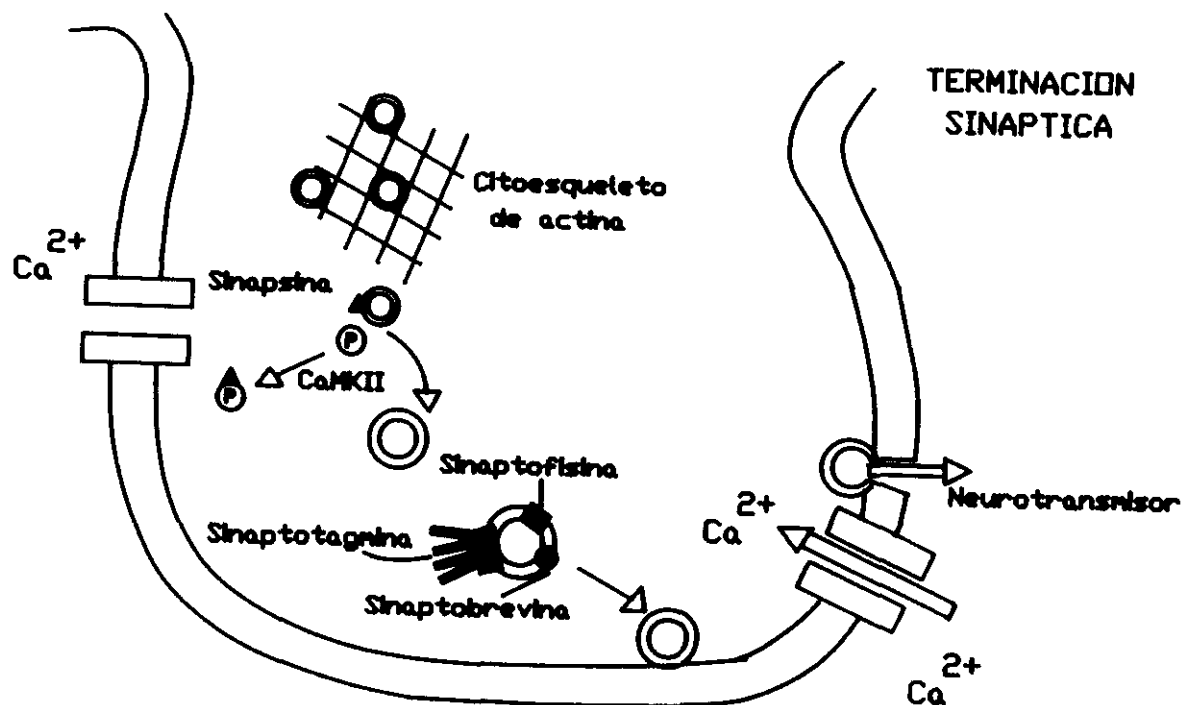
exocitosis de neurotransmisores en el Sistema Nervioso Central, es en muchos casos, insensible a w-conotoxina y que está mediada por canales de tipo P, sensibles a agatoxinas, que parecen predominar en las sinapsis de los mamíferos (Mintz y cols. 1992).

La función exacta de la sinaptotagmina en la liberación de neurotransmisores no es conocida, sin embargo, tanto su localización estratégica, así, como su capacidad para unir múltiples iones de Ca^{2+} , le confiere las propiedades exigidas para el receptor de Ca^{2+} de la exocitosis que antes hemos descrito. Además, la unión de sinaptotagmina al receptor de α -latrotoxina es particularmente llamativa, ya que la toxina a través de su receptor permitiría que la sinaptotagmina adopte la conformación inducida por el Ca^{2+} originando la liberación masiva de neurotransmisor por un mecanismo independiente de Ca^{2+} .

La sinaptofisina es una glicoproteína de las vesículas sinápticas que posee cuatro regiones transmembrana, que es capaz de formar oligómeros de hasta cuatro subunidades en su forma nativa (Südhof y Jahn 1991). Esta proteína, una vez reconstituída en lípidos de membrana, exhibe propiedades de un canal iónico (Thomas y cols. 1988), lo que ha llevado a sugerir que podría formar parte del poro de fusión formando un complejo junto con las proteínas que participan en la colocación de las vesículas en la zona activa de la membrana plasmática. La posible función de sinaptofisina en la liberación de neurotransmisores dependiente de Ca^{2+} se ha estudiado en los oocitos de *Xenopus* (Alder y cols. 1992), demostrándose en estos experimentos que la microinyección de RNA mensajero del cerebro de rata que codifica para esta proteína, lleva a la aparición de liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} , mientras que la microinyección de oligonucleótidos antisinaptofisina ó de anticuerpos contra esta proteína resulta en una reducción de la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} . Estos datos se han interpretado en el sentido de que la sinaptofisina es una proteína esencial para el ensamblaje en el oocito de un aparato exocitótico, similar al neuronal.

La sinaptobrevina es una familia de proteínas que contiene varias isoformas, sinaptobrevinas I y II (también denominadas VAMP I y II, respectivamente) y cellubrevina. La sinaptobrevina es una proteína de membrana de la vesícula sináptica con un solo dominio transmembrana y recientemente se ha descrito su proteólisis por las toxinas tetánica y botulínica tipo B (Schiavo y cols. 1992, Link y cols. 1992).

Esquema 1. Papel de diversas proteínas de las vesículas sinápticas en la exocitosis de neurotransmisores.



La sinapsina está unida a las vesículas sinápticas y a los filamentos de actina. La entrada de Ca^{2+} activa a la CAM-quinasa II (CAM-KII) que fosforila la sinapsina y da lugar a la liberación de las vesículas sinápticas de la red del citoesqueleto. La sinaptotagmina, sinaptofisina y sinaptobrevina, proteínas de las vesículas sinápticas, probablemente juegan un papel importante tanto en la interacción entre la membrana de la vesícula sináptica y la membrana plasmática, como en la formación del poro de fusión que desencadena la liberación del neurotransmisor almacenado en las vesículas sinápticas.

Puesto que es conocida la capacidad de estas toxinas para bloquear la exocitosis sin afectar, al menos aparentemente, la apertura de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, se ha sugerido que la sinaptobrevina podría formar parte del aparato de fusión exocitótico.

En resumen, parece claro que se han dado pasos importantes para el conocimiento del mecanismo de la exocitosis. Así, se ha demostrado que la sinaptotagmina une Ca^{2+} de una forma que depende de la presencia de fosfolípidos y que esta proteína tiene múltiples sitios de unión de Ca^{2+} que deben permitir la cooperatividad de la exocitosis antes señalada. En segundo lugar, se ha observado la asociación de sinaptotagmina con otras proteínas de la membrana como neurexinas, syntaxina y posiblemente con los canales de Ca^{2+} presinápticos y por último, se ha demostrado que tanto la sinaptotagmina como la sinaptofisina y la sinaptobrevina tienen un papel relevante en la exocitosis.

2. EL ACIDO GLUTAMICO COMO NEUROTRANSMISOR.

2.1. Generalidades.

Los primeros neurotransmisores caracterizados en el Sistema Nervioso Central de mamíferos fueron la acetilcolina, las catecolaminas (noradrenalina y dopamina) y la serotonina. Posteriormente, se demostró que los neurotransmisores más abundantes en el Sistema Nervioso Central de mamíferos son determinados aminoácidos (Curtis y Watkins, 1960), que pueden dividirse en dos grandes grupos: aminoácidos inhibidores (GABA y glicina) ó excitadores (glutamato y aspartato) según hiperpolarizen o despolarizen la neurona postsináptica.

El cerebro de los mamíferos contiene altas concentraciones de ácido L-glutámico o glutamato (Erecinska y cols. 1990, Fonnum 1984) que es considerado el neurotransmisor excitatorio más utilizado por la neuronas del del Sistema Nervioso Central. Hay que señalar, que este aminoácido interviene también en el metabolismo intermediario del tejido nervioso, lo que en cierto modo ha dificultado el estudio de sus funciones como neurotransmisor. Entre las diversas funciones del glutamato relacionadas con aspectos metabólicos cabría indicar su participación en la destoxificación del amonio en el cerebro (Yudkoff y cols. 1989), en la síntesis de

proteínas y péptidos, así como su papel precursor del neurotransmisor inhibitorio GABA (Roberts y Frankel 1950).

El glutamato satisface todos los criterios establecidos para que pueda ser considerado como un neurotransmisor. Así, el glutamato se localiza presinápticamente en neuronas específicas y es liberado por estímulos fisiológicos en concentraciones suficientemente altas como para producir respuestas a nivel postsináptico. Además agonistas y antagonistas de sus diversos receptores pueden mimetizar o bloquear estas respuestas y por último existen también mecanismos de recaptura de este aminoácido del espacio sináptico que permiten la terminación de sus acciones postsinápticas.

2.2. Localización de las sinapsis glutamatérgicas.

En términos generales se puede decir que las mayores concentraciones de glutamato en cerebro se encuentran en ciertas regiones corticales, el núcleo caudado y el hipocampo, mientras que regiones como el hipotálamo y el tronco del cerebro contienen concentraciones de glutamato más bajas. Esta distribución se correlaciona, como es de esperar, con la densidad de las vías glutamatérgicas (Fagg y Foster 1983), ya que son estas terminaciones las que utilizan el glutamato para la transferencia de señales entre las neuronas.

La obtención de anticuerpos contra la molécula de glutamato (molécula de glutamato fijada a glutaraldehído) ha permitido su localización inmunocitoquímica (Storm-Mathisen y Ottersen 1987, Ottersen 1989). Ahora bien, debido al hecho de que el glutamato participa también en el metabolismo intermediario, la inmunoreactividad al glutamato está extendida por todo el cerebro, y por tanto, la localización del glutamato neurotransmisor exige la demostración de un enriquecimiento sobre los niveles basales ya de por sí elevados. No obstante, se ha observado que en las terminaciones de las fibras musgosas del cerebelo la inmunorreactividad al glutamato es el doble de la observada en las dendritas de las células granulares (Ottersen 1989).

En otra serie de estudios de localización de las sinapsis glutamatérgicas se ha determinado la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} como índice de liberación vesicular en respuesta a estímulos eléctricos o a la despolarización con concentraciones elevadas de potasio (Nadler y cols. 1977) ó veratridina

(Toggenburger y cols. 1982). No obstante, hay que señalar que el empleo de glutamato o aspartato radiactivos en los experimentos de liberación ha producido resultados confusos. Esto ha sido debido, en parte, al hecho de que el transportador de aminoácidos de la membrana plasmática es común a las terminaciones glutamatérgicas, GABA-érgicas y posiblemente a neuronas no-glutamatérgicas y células gliales, por lo que la liberación de glutamato o aspartato marcado, capturado por las terminaciones a través del transportador, provendría de una gran variedad de terminaciones. Otro problema adicional deriva del hecho que el compartimento vesicular de glutamato se marca más lentamente que el compartimento citoplásmico, obteniéndose en este tipo de experimentos poca radiactividad procedente de las vesículas sinápticas, además de las complicaciones derivadas del metabolismo del glutamato. Para evitar esto, algunos estudios se han realizado con D-aspartico, un análogo no metabolizable del glutamato, sin embargo, los resultados obtenidos ha sido confusos (Fonnum 1984) ya que posteriormente se ha demostrado que el aspartato no es acumulado en las vesículas sinápticas glutamatérgicas y por lo tanto, los estudios de liberación con aspartato como marcador no reflejan el papel del glutamato en las vías glutamatérgicas.

Se han realizado también estudios de transporte de alta afinidad para la localización de las sinápsis glutamatérgicas. Estos estudios se basan en la existencia de un transportador de glutamato en la membrana presináptica que retira la sustancia neurotransmisora del espacio sináptico. Como ya se ha explicado anteriormente, este transportador no es exclusivo de las terminaciones glutamatérgicas. No obstante, la validez de esta técnica de transporte está apoyada por las observaciones de Fykse y Fonnum, de que la distribución regional del transporte de glutamato en vesículas sinápticas, un marcador glutamatérgico inequívoco, es similar a la del transporte de glutamato de la membrana plasmática (Fykse y Fonnum 1989). Con este método se ha establecido que aproximadamente el 15% de las terminaciones sinápticas de una preparación de sinaptosomas de corteza cerebral son glutamatérgicas (Beart 1976). Así mismo, la determinación del transporte presináptico de isótopos radiactivos detectado por autoradiografía, junto con la pérdida de este transporte asociada a la lesión de determinadas vías neuronales se han utilizado para definir el neurotransmisor utilizado por dicha vía (Fonnum 1984).

El transporte de glutamato en vesículas sinápticas y el aislamiento de las mismas ha sido importante para aceptar al glutamato como neurotransmisor (Maycox

y cols. 1990). Así, podría considerarse que el transporte de glutamato dependiente de ATP en vesículas aisladas de una región determinada es el marcador más específico de las vías glutamatérgicas.

2.3. Organización presináptica de las sinapsis glutamatérgicas.

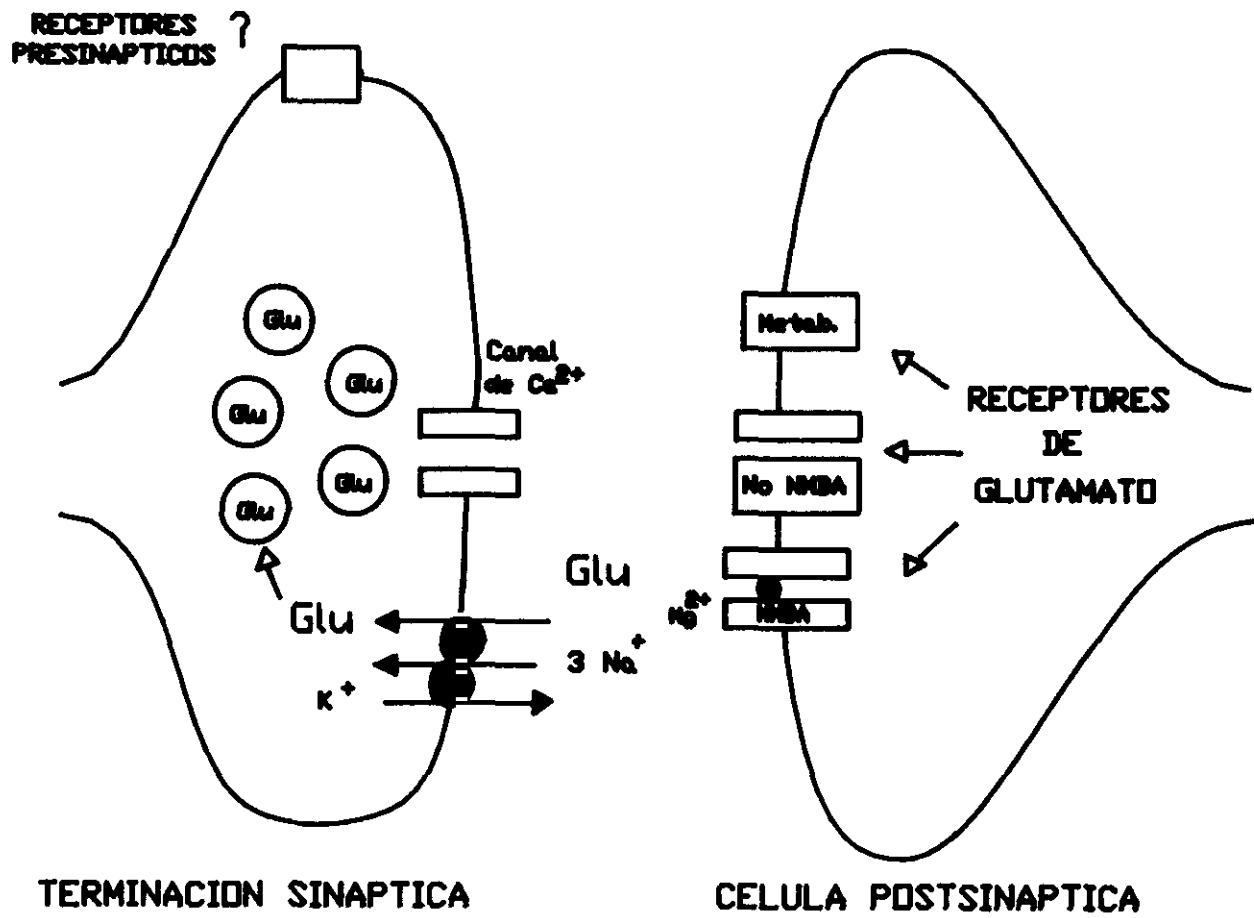
El ácido glutámico almacenado en las vesículas sinápticas es liberado al espacio sináptico por exocitosis del contenido vesicular. La liberación de glutamato es disparada por la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y por la entrada de Ca^{2+} en la terminación sináptica que tiene lugar tras la llegada de un potencial de acción. El ácido glutámico difunde en el espacio sináptico alcanzando los distintos tipos de receptores postsinápticos que median las acciones de este neurotransmisor. Finalmente, un sistema de transporte de los aminoácidos glutamato y aspartato, situado en la membrana de las terminaciones sinápticas y de las células gliales adyacentes, retiran el glutamato del espacio sináptico, con lo que la sinapsis glutamatérgica es silenciada hasta que llega un nuevo potencial de acción.

2.3.1. Transportador de glutamato en la membrana plasmática.

En la membrana plasmática de las terminaciones nerviosas y de las células gliales hay un co-transportador de Na^+ y glutamato (Nicholls y Attwell 1990). Este transportador tiene como función la recaptura del glutamato liberado en el espacio sináptico para finalizar las acciones postsinápticas del neurotransmisor y al mismo tiempo, mantener la concentración extracelular por debajo de unos niveles que puedan resultar tóxicos para las neuronas (Choi 1988). Muy recientemente, se ha conseguido clonar y expresar la secuencia que codifica para un co-transportador Na^+ -glutamato (Pines y cols. 1992, Kanai y cols. 1992).

El co-transportador Na^+ -glutamato no muestra una alta especificidad de sustrato, ya que admite L y D aspártico, L-glutamato aunque no D-glutamato. Este transportador no sólo cataliza la traslocación neta de glutamato (captura o liberación) sino también el intercambio con otros aminoácidos. La K_m aparente para la unión extracelular de glutamato está en el intervalo de 2-50 μM . El ácido glutámico es acumulado en el interior celular en contra de un enorme gradiente de concentración (aproximadamente, 1 μM en el espacio sináptico y 10 mM en el interior celular), necesitándose el transporte de 3 iones Na^+ a favor de gradiente de concentración por

Esquema 2. Organización presináptica de la sinapsis glutamatérgica.



cada molécula de glutamato. También se ha descrito el transporte de un protón junto con 2 iones Na^+ al interior celular (Erecinska 1983). Kanner y cols. describieron hace más de una década el requerimiento de K^+ para el transporte de glutamato (Kanner 1983), hecho que ha sido confirmado más recientemente por el grupo de Attwell que ha demostrado en experimentos de grapado de membrana "patch-clamp" que un ión K^+ se transporta al exterior celular por cada molécula de glutamato que se transporta al interior (Barbour y cols. 1988). Recientemente, se ha descrito que el transporte de glutamato en células gliales un ión OH^- ó HCO_3^- se cotransporta con el K^+ al exterior celular (Bouvier y cols. 1992). Por otro lado, se desconoce la forma iónica en que el glutamato se transporta pero a pH neutro la especie molecular que predomina es la que está cargada negativamente. Por tanto, la estequiometría del transportador podría ser: un anión glutamato cotransportado con 3 iones Na^+ (ó 2 iones Na^+ y un H^+) dentro de la célula y un ión K^+ transportado fuera de la célula, con lo que resultaría un transporte electrogénico. Este sistema de transporte podría mantener un gradiente de concentración de glutamato de 23000 ó 28000, según la estequiometría, a ambos lados de la membrana plasmática (Nicholls y Atwell 1990).

El carácter electrogénico del cotransportador de Na^+ -glutamato hace que en una membrana polarizada el transportador acumule glutamato. Sin embargo, cualquier alteración en el gradiente electroquímico de Na^+ altera también el transporte de glutamato. Así, en sinaptosomas despolarizados con altas concentraciones de ClK , el transportador se revierte mediando la liberación de glutamato citoplásmico como consecuencia de la reducción del componente eléctrico del gradiente electroquímico de Na^+ (Nicholls 1989).

2.3.2. Transporte de glutamato en vesículas sinápticas.

La fuerza conductora de la acumulación de glutamato en vesículas sinápticas es el gradiente electroquímico generado por el bombeo de protones a costa de la hidrólisis de ATP (Maycox y cols. 1988, Cidon y Sihra 1990). Este gradiente electroquímico de protones tiene asociados dos componentes: uno eléctrico, que es el potencial de membrana y otro químico, constituido por el gradiente de pH que hay entre los dos lados de la membrana vesicular. En experimentos con agentes que disipan el gradiente de pH como la metilamina, se ha demostrado que el transporte de glutamato a la vesícula parece no depender del gradiente de pH. Sin embargo, la reducción del potencial de membrana afecta a la acumulación de glutamato, ya que la

liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} no se altera en presencia de metilamina (Sánchez-Prieto y cols. 1987 a). Se ha descrito que los iones Cl^- son imprescindibles para la acumulación de glutamato en vesículas sinápticas (Naito y Ueda, 1983).

El transportador de glutamato de la membrana vesicular es altamente específico, ya que sólo admite L-glutamato (Maycox y cols. 1988). La afinidad por el glutamato de este transportador presenta valores de K_m en el intervalo 1-2 mM, siendo por lo tanto más baja que la del transportador de la membrana plasmática. La baja afinidad de este sistema de transporte junto con la ausencia de un sistema de inactivación osmótica, hacen que las vesículas glutamatérgicas constituyan un reservorio donde el glutamato se acumula entre cinco y diez veces respecto de la concentración citoplásmica. Sin embargo, estas vesículas son el vehículo para una liberación específica y altamente regulada de glutamato.

2.3.3. Liberación y exocitosis de glutamato.

Un gran número de experimentos han demostrado que la liberación de glutamato es dependiente de Ca^{2+} , pero hasta hace unos pocos años no ha sido aceptado el hecho de que el glutamato liberado en la sinapsis procede de las vesículas sinápticas (Erecinska 1983). Esta confusión se ha debido al hecho de que el glutamato además de ser un neurotransmisor, es también un metabolito abundante en las neuronas que está presente en altas concentraciones en el citoplasma. Los primeros estudios de liberación con glutamato radiactivo sugirieron un origen citosólico de este neurotransmisor (De Belleruche y Bradford 1977), ya que la mayor parte del glutamato liberado tras la despolarización de las terminaciones sinápticas era independiente de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, proponiéndose que esta liberación de glutamato estaba mediada por la reversión del transportador de Na^+ -glutamato de la membrana plasmática. Estos resultados se explican en parte, porque con glutamato radiactivo el componente vesicular se marca más lentamente que el componente citoplásmico. Además, la existencia de una elevada concentración de glutamato en el citoplasma implica que hay que determinar la liberación de glutamato vesicular por encima de un fondo de liberación citoplásmica que es todavía mayor en aquellos experimentos en los que se induce una despolarización permanente como en el caso de altas concentraciones de ClK ó con veratridina. Estos problemas se resolvieron en buena medida, determinando la liberación de glutamato endógeno. El grupo del Dr. Nicholls de la Universidad de Dundee ha demostrado con un ensayo

fluorimétrico en el que la liberación de glutamato se acopla a la reducción de NADP por el enzima glutamato deshidrogenasa, la existencia de dos vías de liberación para el glutamato (Nicholls y Shira 1986, Sánchez-Prieto y cols. 1987 a): una vía de exocitosis del neurotransmisor almacenado en vesículas sinápticas que está fuertemente acoplada a la entrada de Ca^{2+} en la terminación sináptica y una segunda vía que libera glutamato citoplásmico y que está mediada por la reversión del transportador de glutamato de la membrana plasmática.

La liberación de glutamato citoplásmico, es un proceso independiente de Ca^{2+} y no dependiente de ATP, es más, la liberación del compartimento citoplásmico se incrementa en condiciones en que disminuye el contenido de ATP (Sánchez-Prieto y cols. 1987 a, Sánchez-Prieto y González, 1988). En este sentido, se ha sugerido que esta vía de liberación de glutamato citoplásmico podría contribuir a las acciones neurotóxicas de este neurotransmisor durante las situaciones de anoxia e isquemia cerebrales, porque en las condiciones experimentales que simulan estas situaciones con inhibidores metabólicos ó por deplección de O_2 del medio, se ha observado que la reducción de los niveles de ATP, bloquea la exocitosis de glutamato, mientras que por el contrario aumenta la salida de glutamato citoplásmico por la reversión del transportador. Esta acumulación de glutamato en el espacio sináptico podría ser la responsable de una sobreestimulación de los receptores postsinápticos, y consecuentemente del daño neuronal.

Utilizando el ensayo fluorimétrico antes mencionado para medir la exocitosis de glutamato en sinaptosomas se pueden distinguir dos fases, una fase rápida, que termina a los 2 segundos de la estimulación, seguida de una fase más lenta en la que se libera más glutamato, con una liberación semimáxima a los 52 segundos. Tanto la fase rápida como la lenta de liberación requieren Ca^{2+} en el medio extracelular y unos determinados niveles intrasinaptosomales de ATP. Si bien, hay que tener en cuenta que este ensayo no mide la liberación en tiempo real, las dos fases de liberación podrían indicar la localización de dos poblaciones de vesículas sinápticas distintas: una población de vesículas colocadas en la zona activa y otra población situada en una zona más alejada. Es razonable pensar que la fase rápida corresponde a la liberación de las vesículas colocadas en la zona activa, mientras que la fase lenta podría reflejar la movilización y liberación de las vesículas sinápticas de la formación reticular del citoesqueleto (McMahon y Nicholls 1991). De acuerdo con esta idea, se ha descrito que las toxinas tetánica y botulínica son capaces de bloquear solo una parte

de la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} (Sánchez-Prieto y cols. 1987 b), que parece corresponder a la fase lenta (McMahon y cols. 1992).

La exocitosis de glutamato está estrechamente controlada por un aumento localizado en la concentración intracelular de Ca^{2+} en la zona activa de la sinapsis, donde se encuentran localizadas las vesículas sinápticas (Smith y Augustine 1988). La entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje es mucho más eficaz a la hora de inducir la exocitosis de glutamato, que la entrada deslocalizada de Ca^{2+} inducida por ionóforos como la ionomicina (McMahon y Nicholls, 1991).

La despolarización de los terminales sinápticos con ClK induce una elevación permanente en la concentración citosólica de Ca^{2+} que es bifásica: en primer lugar hay una elevación transitoria de la concentración intracelular de Ca^{2+} seguida de una elevación más sostenida (Adam-Vizi y Ashely 1987). El componente mayoritario de la liberación de glutamato está asociado a la elevación permanente de la concentración citosólica de Ca^{2+} porque la predespolarización de los sinaptosomas con ClK seguida de la adición de Ca^{2+} conlleva la pérdida del componente transitorio en la elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} , pero no la pérdida de la exocitosis de glutamato. Estos experimentos implican además que la exocitosis de este neurotransmisor, está acoplada a canales de Ca^{2+} que no se inactivan por despolarización de la membrana plasmática (McMahon y Nicholls 1990). Experimentos realizados con diversos antagonistas de los distintos tipos canales de Ca^{2+} han puesto de manifiesto que los canales de Ca^{2+} acoplados a la exocitosis de glutamato no parecen corresponderse con ninguno de los tres tipos de canales de Ca^{2+} descritos en el ganglio dorsal de pollo (Nowycky y cols. 1985). Estos canales presinápticos de Ca^{2+} no parecen ser de los tipos L ni N, ya que la exocitosis de glutamato es insensible a dihidropiridinas y a w-conotoxina, respectivamente. Sin embargo, estos canales podrían responder a un nuevo tipo de canal de Ca^{2+} descubierto recientemente, ya que dos toxinas obtenidas a partir del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*, Aga-GI y w-Aga-IVA bloquean la liberación de glutamato inducida por ClK y por 4-aminopiridina (Pocock y Nicholls 1992, Turner y cols. 1992) y se sugiere la existencia de al menos de dos tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje asociados la despolarización de la membrana plasmática, uno que es insensible a estas toxinas y que no estaría acoplado a la liberación exocitótica de glutamato, siendo responsable de la elevación transitoria de la concentración intracelular de Ca^{2+} y otro sensible a estas toxinas y que podría estar relacionado con

los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo P, descritos en las células de Purkinje (Minzt y cols. 1992).

2.3.4. Receptores de glutamato.

El glutamato liberado en el espacio sináptico interacciona, al menos, con dos tipos de receptores que han sido definidos en base a sus características farmacológicas, electrofisiológicas y bioquímicas: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos están constituidos por canales iónicos y en función de sus ligandos específicos se clasifican en receptores tipo NMDA y receptores AMPA-kainato (Monaghan y cols. 1989). Los receptores tipo metabotrópico se encuentran acoplados a proteínas G y modulan la producción de segundos mensajeros intracelulares (Schoepp y Conn 1993).

2.3.4.1. Receptores de NMDA.

Este receptor responde al agonista N-metil-D-aspartico y se designa abreviadamente como receptor NMDA. La activación del receptor de NMDA abre un canal altamente permeable a iones Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} (Mayer y Westbrook 1987). Existen varios sitios alostéricos y reguladores asociados a este receptor que modulan su respuesta. Los sitios de unión del Mg^{2+} , del antagonista no competitivo, fenciclidina y del Zn^{2+} están localizados en el canal iónico. El bloqueo dependiente de voltaje al que está sometido este receptor por Mg^{2+} (MacDonald y Nowak 1990) hace necesaria una despolarización previa de la membrana plasmática, que anule este bloqueo y permita la activación del canal iónico asociado a este receptor (MacDermott y Dale 1987). En el sitio de unión de la fenciclidina, se unen también algunos anestésicos locales como la ketamina y el MK-801, que en su conjunto, antagonizan las respuestas inducidas por NMDA. El ión Zn^{2+} se une también al canal iónico del receptor de NMDA, produciendo un bloqueo del mismo en el que se puede distinguir dos componentes, uno dependiente y otro independiente de voltaje (Westbrook y Mayer 1987).

Fuera del canal iónico se encuentra los sitios de unión de la glicina, del agonista NMDA y de las poliaminas. La glicina a concentraciones submicromolares activa el receptor de NMDA (Johnson y Asher 1987) y su unión parece ser imprescindible para que el receptor sea activado (Kleckner y Dingledine 1988). El

sitio de unión de glicina se colocaliza con el receptor de NMDA en el cerebro (Cotman e Iversen 1987) y su unión no es bloqueada por estricnina, pero sí, por antagonistas competitivos como kinurenato y HA966 (Birch y cols. 1988), tratándose, por tanto, de un sitio de unión distinto al del receptor inhibitor de glicina que se ha descrito en la médula espinal. En el sitio de unión de NMDA se une el antagonista competitivo y selectivo del receptor NMDA, el ácido 2-amino-5-fosfopentanoico, AP5, que permite distinguir las acciones mediadas por los receptores de NMDA de las de otros receptores de glutamato como los subtipos Kainato-AMPA ó metabotrópico (Davies y cols. 1981). Las poliaminas, espermina y espermidina, interaccionan en un sitio específico, incrementando la corriente de Ca^{2+} a través del receptor de NMDA (Dawson y cols. 1990, Williams y cols. 1991).

El receptor NMDA ha sido purificado por cromatografía de afinidad y se ha sugerido que este receptor, al igual que los receptores acoplados a canales, es un complejo hetero-oligomérico que incluye los sitios de unión anteriormente descritos en sus diferentes subunidades (Ly y Michaelis 1991). Recientemente, se ha conseguido clonar y expresar las secuencias de DNA que codifican al menos, para cuatro subunidades del receptor NMDA (Moyoroshi y cols. 1991). La expresión de cada una de estas subunidades en oocitos de *Xenopus* lleva a la constitución de estructuras homo-oligómeras, que reproducen muchas de las características del receptor de NMDA.

2.3.4.2. Receptores de AMPA-Kainato.

Los receptores de Kainato/ α -amino-3 hidroxil-5 metilisoxazolil-4 propionato (kainato/AMPA), denominados también receptores Qp, constituyen un subtipo de receptores de glutamato cuya estimulación activa un canal iónico permeable a Na^{+} y a K^{+} , pero no a cationes divalentes (Young y Fagg 1990). El resultado de su activación es la despolarización de la membrana, y se considera que estos receptores median la transmisión excitatoria rápida de las vías glutamatérgicas. Los derivados de quinoxalinas CNQX y NBQX son los antagonistas más selectivos para estos receptores, careciendo de efecto sobre las respuestas mediadas por los receptores NMDA ó de tipo metabotrópico (Honoré y cols. 1988).

Estudios de biología molecular de los receptores de Kainato/AMPA han demostrado la existencia de diferentes subtipos de receptores denominados GluR1, 2,

3, 4, 5 y 6 ó también GluR A-F (Keinänenn y cols. 1990). Aunque todas las subunidades desde GluR1 hasta GluR6 son capaces de formar canales iónicos cuando se expresan en oocitos de *Xenopus* ó en células cultivadas de mamíferos (Boulter y cols. 1990, Keinänenn y cols. 1990), se considera probable que "in vivo" estos canales están formados por diferentes combinaciones de subunidades, esto implica que con las seis subunidades descubiertas hay un gran número de combinaciones potenciales. El subtipo GluR6 es activado por kainato pero no por AMPA, por lo que podría tratarse de un auténtico receptor de kainato más que de un receptor kainato/AMPA (Huettner 1990).

En algunos estudios con neuronas y células gliales se ha demostrado que los receptores Kainato/AMPA pueden ser permeables también al Ca^{2+} . En algunas células de hipocampo, el canal activado por kainato es más permeable al Ca^{2+} que al Na^+ (Hollmann y cols. 1991). Esta inesperada permeabilidad al Ca^{2+} de los receptores de Kainato/AMPA se puede explicar por alguna de las observaciones hechas en estudios de biología molecular. La expresión de GluR1, GluR3 ó de una combinación GluR1-GluR3, lleva a la formación de canales iónicos permeables al Ca^{2+} . Ahora bien, si a la mezcla se añade GluR2, se obtiene la típica impermeabilidad al Ca^{2+} de los receptores Kainato-AMPA. Estos cambios en la permeabilidad al Ca^{2+} en los distintos subtipos de receptores parece ser debido a la sustitución en la secuencia de aminoácidos de GluR2 de una arginina por glutamina presente en las otras subunidades (Hollmann y cols. 1991).

2.3.4.3. Receptores metabotrópicos.

En 1985, Sladeczek y cols. demostraron en cultivos neuronales procedentes de estriado la existencia de un nuevo tipo de receptor de glutamato activado por quisqualato y glutamato, pero no por NMDA y kainato (Sladeczek y cols. 1985). La unión del agonista a este receptor se traduce en la activación proteína G-dependiente de una fosfolipasa C con el resultado de la hidrólisis del fosfatidilinositol de la membrana plasmática y la generación de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol como segundos mensajeros (Manzoni y cols. 1990, Schoepp y cols. 1990). El IP_3 activa la movilización de Ca^{2+} de reservorios intracelulares (Murphy y Miller 1988, Adamson y cols. 1989) mientras que el diacilglicerol activa a la proteína quinasa C (Manzoni y cols. 1990). Este receptor de glutamato está presente en diversas preparaciones como cultivos de células granulares de cerebelo (Nicoletti y cols.

1988), de células gliales (Pearce y cols. 1986), ó sinaptoneurosomas (Recansens y cols. 1988) y se puede expresar en oocitos de *Xenopus* tras la inyección de mRNA de cerebro de rata (Sugiyama y cols. 1987). Recientemente, se ha descrito la existencia de otros receptores metabotrópicos acoplados, en este caso, a la modulación de los niveles intracelulares de AMP_c (Schoepp y cols. 1992, Winter y Conn 1992).

Mediante técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha conseguido aislar y expresar las secuencias de cDNA que codifican para seis subtipos de receptores metabotrópicos denominados mGluR1, 2, 3, 4, 5 y 6, (Nakaniski 1992, Schoepp y Conn 1993). El estudio y comparación de sus secuencias polipeptídicas revelan que todas estas proteínas son muy similares entre sí pero que carecen de homología con otros receptores pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteína G. Los receptores metabotrópicos están constituidos siete segmentos transmembrana y un extremo amino terminal con numerosos residuos de cisteína (Tanabe y cols. 1992). Además de los subtipos de receptores metabotrópicos antes señalados, el procesamiento alternativo del RNA mensajero es otra fuente de diversidad, habiéndose observado que para el subtipo mGluR1 por procesamiento alternativo de su RNA mensajero se originan las variantes α , β y γ (Pin y cols. 1992).

La expresión de estos clones en las células ováricas de Hamster chino ha permitido conocer algunas características individuales de los subtipos de receptores metabotrópicos. Los subtipos mGluR1 y mGluR5 están acoplados una fosfolipasa y a la hidrólisis de los fosfoinosítoles. Ambos tipos de receptores muestran el mismo perfil farmacológico, con un orden de potencia EC₅₀ para la hidrólisis de fosfoinosítoles de Quisqualato > L-Glutamato > Ibotenato > ACPD (Tanabe y cols. 1992). Sin embargo, ambos subtipos difieren en su sensibilidad a toxina pertusis, ya que mientras mGluR5 y mGluR1 β son insensibles a toxina pertusis, mGluR1 α es activado por un mecanismo sensible a esta toxina (Abe y cols. 1992, Pickering y cols. 1993). Por el contrario, mGluR2, mGluR3, mGluR4 y mGluR6 se encuentran acoplados negativamente a la vía de la adenilato ciclasa, inhibiendo la formación de cAMP (Prezeau y cols. 1992, Thomsen y cols. 1992). El perfil farmacológico de estos receptores es diferente, ya que quisqualato, que es el agonista más potente para los receptores acoplados a la hidrólisis de los lípidos de inositol, muestra una actividad baja sobre estos tipos de receptores. El orden de potencia EC₅₀ es Glutamato > ACPD > Ibotenato > Quisqualato. El subtipo mGLUR4 presenta

como agonista más potente L-AP4. Todos los subtipos de receptores metabotrópicos acoplados negativamente a la vía de la adenilato ciclasa, son sensibles a toxina pertusis (Nakanishi 1992).

Recientemente se ha descrito dos nuevos agonistas selectivos para los receptores metabotrópicos mGluR2 y mGluR4, el L-2-carboxiciclopropil glicina (L-CCGI) y 2,3-dicarboxiciclopropil glicina (DCG-IV), que inhiben fuertemente la formación de AMP_c inducida por forskolina (Ishida y cols. 1993 a, Ishida y cols. 1993 b).

No existe un verdadero antagonista que permita caracterizar de manera inequívoca las acciones asociadas a la activación de los receptores metabotrópicos, tanto en el caso de los receptores acoplados a la hidrólisis de fosfatidilinositoles como en el caso de los receptores acoplados a la modulación de los niveles de AMP_c (Schoepp y Conn 1993). Aunque los primeros estudios mostraron que el ácido L-4-aminofosfobutírico (L-AP4) presenta actividad antagonista sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos estimulada por ibotenato y quisqualato en cortes de hipocampo y corteza cerebral (Schoepp y cols. 1990), sin embargo, en cultivos de neuronas corticales (Patel y cols. 1990) y en sinaptoneurosomas (Recasens y cols. 1988), L-AP4 no muestra tal actividad. Otro tanto se podría decir del ácido L-3-aminofosfopropiónico, L-AP3, ya que este compuesto en cortes de hipocampo se manifiesta como un bloqueante efectivo de la hidrólisis de fosfoinositoles estimulada por agonistas metabotrópicos (Schoepp y Johnson 1989, Schoepp y cols. 1990, Irving y cols. 1990). Sin embargo, en cortes de cerebelo (Crepel y cols. 1991), en cultivos de neuronas piramidales de hipocampo (Stratton y cols. 1990) y en las células ováricas del Hamster chino que expresan receptores de glutamato (Tanabe y cols. 1992, Abe y cols. 1992) la hidrólisis de los fosfatidilinositoles es insensible a L-AP3. Más recientemente se ha descrito que (RS) α -metil-4-carboxifenilglicina es un antagonista para el receptor metabotrópico acoplado a la hidrólisis de fosfatidilinositoles en corteza cerebral (Eaton y cols. 1993).

Numerosos experimentos han demostrado que el receptor metabotrópico reduce el potencial postsináptico excitatorio (PEPS) en las sinápsis glutamatérgicas de hipocampo (Baskys y Malenka 1991), de amígdala (Rainnie y Shinnick-Gallagher 1992), de estriado (Lovinger 1991) y de cerebelo (Crepel y cols. 1991). Esta acción inhibitoria parece estar mediada por la activación de un autoreceptor presináptico que

inhibe la liberación de glutamato. En el hipocampo, la reducción en los PEPS inducida por el agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD, no es bloqueada ni mimetizada por L-AP3 (Desai y Conn 1991), lo que sugiere que el receptor metabotrópico que media este efecto inhibitorio podría ser diferente de los receptores que median la hidrólisis de fosfoinositoles sensibles a L-AP3 (Schoepp y cols. 1990). L-AP4 también es un bloqueante de los PEPS en algunas sinapsis glutamatérgicas (Rainnei y Shinnick-Gallagher 1992). Los receptores metabotrópicos también reducen el potencial postsináptico inhibitorio (PIPS) en las sinapsis glutamatérgicas y este efecto parece estar mediado por inhibición en la liberación de GABA (Desai y cols. 1992). El mecanismo de acción por el cual los receptores metabotrópicos inhiben la liberación de glutamato y GABA no se conoce, pero se ha sugerido que esta acción podría estar mediada por una reducción en la corriente de Ca^{2+} de la terminación sináptica (Trombley y Westbrook 1992).

Los receptores metabotrópicos también han sido implicados en la modulación de diversos canales iónicos y de otros receptores (Schoepp y Conn, 1993). En cultivos de células piramidales de hipocampo, trans-ACPD disminuye la corriente de K^{+} , tanto de los canales de K^{+} dependientes de voltaje tipo I_m , como de los canales de K^{+} dependientes de Ca^{2+} , I_{aph} , incrementando el potencial de membrana en reposo y por tanto, la excitabilidad celular (Stratton y cols. 1989, Charpak y cols. 1990, Hu y Storm, 1992). Así mismo, también se ha observado que trans-ACPD reduce la corriente de Ca^{2+} en cultivos neuronales de hipocampo (Lester y Jahr, 1990) y en cultivos de neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo (Swartz y Bean 1992, Swartz y cols. 1993). En relación con la modulación por los receptores metabotrópicos de otros receptores, se ha observado que trans-ACPD incrementa la corriente de Ca^{2+} del receptor de NMDA en cultivos de células piramidales de hipocampo y en oocitos de *Xenopus* que expresan este receptor. Esta acción parece estar mediada por receptores de glutamato acoplados a la hidrólisis de fosfoinositoles ya que los activadores de la proteína quinasa C mimetizan este efecto (Aniksztejn y cols. 1991). Además los receptores metabotrópicos han sido implicados en importantes procesos neuronales como el desarrollo neuronal (Nicoletti y cols. 1988), aprendizaje y memoria (Zheng y Gallagher 1992, McGuinness y cols. 1991), así como en la neurotoxicidad inducida por el glutamato (Koh y cols. 1991).

3. EL SINAPTOSOMA COMO MODELO DE SINAPSIS "IN VITRO".

Las terminaciones sinápticas de las neuronas constituyen la región especializada en la liberación de neurotransmisores. Estas terminaciones sinápticas se pueden aislar y mantener activas desde el punto de vista metabólico durante varias horas (Nicholls 1989), constituyendo la preparación denominada sinaptosomas. El aislamiento de las terminaciones sinápticas está facilitado por su pequeño tamaño y por el resellado espontáneo que experimenta la membrana sináptica tras la homogenización del tejido cerebral en medio isotónico. La posible explicación de porqué los procesos celulares pueden continuar en una terminación nerviosa aislada del cuerpo celular está en relación con su propio diseño, ya que al estar separada del cuerpo celular por una gran distancia, la terminación sináptica está preparada para funcionar de una manera autónoma, desde el punto de vista metabólico. Las terminaciones nerviosas contienen la dotación enzimática y proteica necesaria para llevar a cabo la síntesis de neurotransmisores y su almacenamiento en vesículas (Nicholls 1989).

Los sinaptosomas tienen un diámetro aproximado de 1 μm . En las imágenes de microscopía electrónica se observa un gran contenido en vesículas sinápticas pequeñas y en menor número, vesículas sinápticas grandes, densas y con cubierta. Las vesículas sinápticas pequeñas tienen un diámetro aproximado de 50 nm y frecuentemente se encuentran ancladas en determinadas regiones de la membrana plasmática, denominadas zonas activas. Las vesículas sinápticas grandes son menos frecuentes y están localizadas fuera de la zona activa (Buma 1989). Aparte de las vesículas sinápticas, los sinaptosomas presentan una o dos mitocondrias y la red del citoesqueleto.

El principal problema de la preparación de sinaptosomas, en relación con el contenido de neurotransmisores, es su heterogeneidad. Así, los sinaptosomas de cualquier región cerebral contienen terminaciones sinápticas de neuronas que utilizan diferentes neurotransmisores como glutamato, GABA, acetilcolina, catecolaminas, péptidos y otros transmisores, junto con alguna terminación glial o gliosomas. El grupo de Bradford ha conseguido aislar poblaciones colinérgicas y GABA-érgicas de sinaptosomas por métodos inmunológicos, empleando anticuerpos contra las enzimas implicadas en su síntesis (Docherty y cols. 1987). En general, los sinaptosomas pueden prepararse de distintas regiones cerebrales según el sistema de neurotransmisor

que se quiere estudiar. Así, los interesados en la acetilcolina utilizan los lóbulos ópticos del calamar y el órgano eléctrico de Torpedo (Whittaker 1984), ya que en ambos casos se trata de un sistema colinérgico puro. Para la investigación de la neurotransmisión glutamatérgica se pueden utilizar los sinaptosomas de corteza cerebral, que aunque no es una preparación exclusivamente glutamatérgica, contiene glutamato en altas concentraciones. Por otro lado, la preparación de sinaptosomas a partir de la neurohipófisis es útil en el estudio de la secreción de neurohormonas (Matteoli y cols. 1989).

La membrana plasmática de los sinaptosomas, al igual que la membrana neuronal, presenta un alta conductancia al ión K^+ y una baja conductancia al ión Na^+ (Schmalzing 1985), con un potencial de membrana muy cercano al potencial de Nerst para el ión K^+ y que oscila entre -60 a -80 mv según las distintas preparaciones (Scott y Nicholls 1980, Tibbs y cols 1989 a). La gran conductancia que presenta la membrana plasmática a los iones K^+ sugiere la existencia de una subclase de canales de K^+ , aún no identificados, que permanecen abiertos en reposo y que son responsables de la alta permeabilidad a este catión. Además de este canal de K^+ , en la terminación sináptica se ha descrito la presencia de un canal de K^+ que participa en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y que se denomina canal tipo I_A . Este canal de K^+ que se encuentra cerrado en condiciones de reposo, se activa rápidamente cuando la membrana se despolariza ligeramente, restableciendo así el potencial de membrana (Castle y cols. 1989). El bloqueo de este canal por 4-aminopiridina o dendrotoxina desestabiliza el potencial de membrana pudiendo desencadenar potenciales de acción espontáneos (Tibbs y cols. 1989 a y b). También se han descrito canales de K^+ dependientes de voltaje tipo I_D o rectificador retrasado y canales de K^+ activados por Ca^{2+} , que están encargados de terminar los potenciales de acción, restableciendo el potencial de membrana en reposo tras la despolarización (Blaustein y cols. 1988).

Los sinaptosomas mantienen una baja concentración de Ca^{2+} intracelular que oscila entre 100-300 nM (Ashely 1986) en ausencia de estimulación. Este bajo nivel de Ca^{2+} se consigue gracias a diferentes sistemas que participan en la homeostasis del Ca^{2+} como son: el intercambiador Na^+/Ca^{2+} , la ATP-asa dependiente de Ca^{2+} y los compartimentos intrasinaptosomales. El intercambiador Na^+/Ca^{2+} , trasloca 3 iones Na^+ por cada ión Ca^{2+} y se activa alostéricamente con Ca^{2+} interno y posiblemente contribuye a la salida de Ca^{2+} cuando su concentración en el citoplasma aumenta por

encima de los niveles basales. El carácter electogénico de este intercambiador a llevado a sugerir su posible contribución a la entrada de Ca^{2+} durante la despolarización de la terminación sináptica, aunque la falta de buenos bloqueantes de este intercambiador ha impedido establecer de manera inequívoca su contribución en la homeostasis del Ca^{2+} en la terminación sináptica. La ATP-asa dependiente de Ca^{2+} de la membrana plasmática bombea un ión Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada y algunos autores sugieren que es el principal mecanismo para extraer Ca^{2+} del citoplasma (Nicholls y Akerman 1981 y Snelling y Nicholls 1985). El retículo endoplásmico liso y las mitocondrias son los compartimentos intrasinaptosomales de Ca^{2+} , capaces de almacenar o liberar Ca^{2+} (Blaustein 1988). El retículo endoplásmico tiene una gran afinidad por el Ca^{2+} pero su capacidad de almacenamiento es bastante limitada, mientras que las mitocondrias presentan una gran capacidad para acumular Ca^{2+} pero con baja afinidad.

3.1. Métodos empleados para inducir la liberación de neurotransmisores.

El sinaptosoma aislado al carecer de su punto de unión con el axón, no puede recibir la señal despolarizante, por lo que deben utilizarse distintos métodos bioquímicos para despolarizar los sinaptosomas e inducir la liberación de neurotransmisores. Entre las distintas formas, las más empleadas son una alta concentración de ClK, el activador de canales de Na^+ , veratridina ó el bloqueante de canales de K^+ , 4-aminopiridina.

- Altas concentraciones de KCl.

En una terminación sináptica en reposo la conductancia dominante de la membrana plasmática es la del K^+ (Schmalzing 1985) y es la que contribuye principalmente al potencial de membrana. El incremento de la concentración extracelular de K^+ despolariza la membrana plasmática, abriendo los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Esta apertura de los canales de Ca^{2+} tras la despolarización se pone de manifiesto tanto por la rápida entrada de Ca^{2+} radiactivo, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Tibbs y cols. 1989 a) como por la elevación en la concentración citosólica de Ca^{2+} determinada con los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} (Adam-Vizi y Ashley 1987).

La despolarización inducida por ClK es continua y total, ya que el potencial no se recupera hasta que no se elimine el agente despolarizante del medio. Hay que tener

en cuenta que la despolarización con ClK, se reduce el componente eléctrico del gradiente electroquímico de Na^+ , revertiéndose el transportador de glutamato y liberando glutamato citoplásmico. A pesar de estos inconvenientes este es el método bioquímico más utilizado.

- Veratridina.

La veratridina es un alcaloide que despolariza la membrana plasmática al impedir la inactivación de los canales de Na^+ (Blaustein y Goldring 1975). Este incremento de la permeabilidad al Na^+ , reduce el potencial de membrana y causa la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje lo que a su vez dispara la liberación de neurotransmisores (Rugolo y cols. 1986). Ahora bien, la veratridina al reducir los dos componentes del gradiente electroquímico de Na^+ , revierte el transportador de glutamato, induciendo una salida de glutamato citoplásmico que es incluso mayor a la inducida por despolarización con ClK donde sólo se altera el gradiente eléctrico. El Na^+ que entra a través de los canales abiertos por veratridina es bombeado al exterior a través de la ATP-asa dependiente de Na^+ y K^+ . La entrada masiva de Na^+ que tiene lugar en presencia de veratridina, activa la ATP-asa estimulando fuertemente la respiración sinaptosomal como consecuencia de la disminución de los niveles de ATP. Este efecto hay que tenerlo muy presente en los experimentos de liberación de neurotransmisores ya que se ha observado que la exocitosis de glutamato es dependiente de ATP (Sánchez-Prieto y cols. 1987 a). Para prevenir la caída de los niveles de ATP inducidos por este ciclo fútil de Na^+ , que se establece entre la entrada de Na^+ mediada por el alcaloide y la salida de Na^+ por la actividad de la bomba de Na^+ , se recomienda la adición del bloqueante de la ATPasa Na^+-K^+ , ouabaina.

- 4-Aminopiridina.

La 4-aminopiridina es un bloqueante de los canales de potasio (Thesleff 1980), activo en los canales que se abren inmediatamente después de la despolarización y que se inactivan rápidamente (10-100 ms) (Smith 1989). La función de estos canales es impedir que las neuronas disparen por debajo del umbral necesario para producir un potencial de acción. Así, la rápida apertura de estos canales de K^+ tras una ligera despolarización permite la rápida repolarización de la célula restableciéndose el potencial de membrana. El bloqueo de estos canales por 4-aminopiridina por el

contrario, establece un potencial de membrana inestable que permite la apertura aleatoria de los canales de Na^+ en la población de sinaptosomas, con la consiguiente despolarización y apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Como consecuencia de estos acontecimientos, 4-aminopiridina induce la liberación dependiente de Ca^{2+} de neurotransmisores. La implicación de los canales de Na^+ en el mecanismo de despolarización desencadenado por 4-aminopiridina, se pone de manifiesto porque el bloqueante de estos canales, tetrodotoxina, suprime tanto la elevación en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} como la liberación de glutamato inducidos por 4-aminopiridina (Tibbs y cols. 1989 a).

El caracter transitorio de las despolarizaciones inducidas por 4-aminopiridina se traduce en una menor liberación de glutamato citoplásmico, sobre todo si se compara con la liberación de glutamato independiente de Ca^{2+} inducida por veratridina, ya que en este último caso se produce un colapso permanente de los componentes químico y eléctrico del gradiente electroquímico de Na^+ .

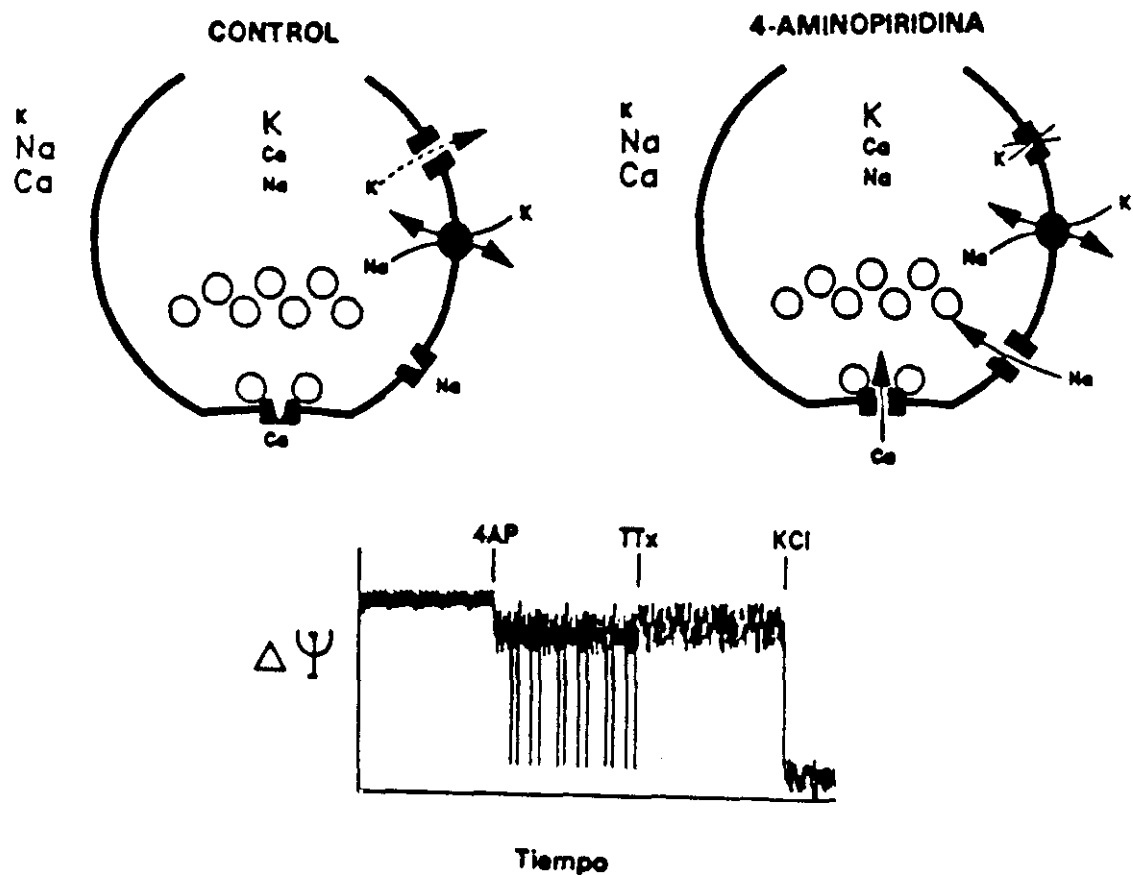
4. MODULACION DE LA LIBERACION DE GLUTAMATO.

4.1. Receptores presinápticos.

Los receptores presinápticos se denominan autoreceptores, si responden al neurotransmisor liberado por la terminación sináptica, ó heteroreceptores, cuando responden a neurotransmisores distintos al liberado por la terminación sináptica. La activación de estos receptores altera parámetros directamente relacionados con la exocitosis, modulando así la liberación de neurotransmisores.

En las terminaciones glutamatérgicas se han descrito la presencia de diversos receptores. Así se ha demostrado la existencia de un autoreceptor de glutamato, sensible a L-AP4 que inhibe la liberación de glutamato en sinaptosomas de corteza cerebral y de hipocampo (Jones y Roberts 1990, Gannon y cols. 1989). Por otro lado, en experimentos de electrofisiología se ha puesto de manifiesto que L-AP4 y/ó (1S,3R)ACPD reducen el potencial postsináptico excitatorio en las sinapsis glutamatérgicas de hipocampo (Baskys y Malenka 1991), estriado (Lovinger 1991) y amígdala (Rainnie y Shinnick-Gallagher 1992). Esta disminución de la transmisión glutamatérgica se ha relacionado con una disminución en la liberación de glutamato,

Esquema 3: Posible mecanismo de acción de 4-aminopiridina



La 4-aminopiridina, 4-AP causa una ligera despolarización alrededor de la cual el potencial de membrana oscila. Eventualmente, el potencial cae lo suficiente para activar los canales de Na^+ que se abren inactivándose rápidamente. Por lo tanto, se produce un disparo repetido de las terminaciones sinápticas que lleva a la apertura de canales de Ca^{2+} . La aplicación de tetrotoxina, TTx, bloquea los canales de Na^+ impidiendo las despolarizaciones transitorias inducidas por 4-aminopiridina. La adición de ClK, en cambio, induce una despolarización permanente de la membrana plasmática.

posiblemente mediada por la activación de un autoreceptor de glutamato que reduce la entrada de Ca^{2+} (Trombley y Westbrook 1992).

Numerosos estudios muestran que los agonistas kainato y domoato inducen un incremento en la concentración de glutamato en el espacio extracelular en cortes de hipocampo y este efecto podría estar relacionado con determinadas acciones neurotóxicas asociadas a este neurotransmisor (Meldrum y Garthwaite 1990). En este sentido, se ha propuesto que estas sustancias interaccionan con un receptor presináptico, que estaría presente en aquellas áreas cerebrales que son especialmente sensibles a las acciones excitotóxicas. En las terminaciones de las fibras musgosas de hipocampo, se ha demostrado la existencia de un receptor presináptico sensible a kainato y domoato que incrementa la liberación de glutamato inducida por CIK (Terrian y cols. 1991). El mecanismo por el cual se incrementa la liberación de glutamato no se conoce, pero este efecto facilitador podría estar mediado por un incremento en la entrada de Ca^{2+} (Terrian y cols. 1991). No obstante y a pesar de todos estos datos, hay que tener en cuenta que el kainato induce la acumulación de glutamato en el medio extracelular por un efecto inhibitorio sobre el co-transportador de Na^{+} -glutamato (Pocock y cols. 1988).

En cuanto a la presencia de heteroreceptores en las terminaciones sinápticas glutamatérgicas, existen numerosas evidencias que indican que la adenosina, a través de su receptor A_1 , inhibe la liberación de glutamato en diversas preparaciones (Dolphin y Archer 1983, Burk y Nadler 1988, Terrian y cols. 1989). Recientemente, Barrie y cols. han descrito que la adenosina y el agonista de los receptores A_1 N_6 ciclohexiladenosina inhiben la liberación de glutamato inducidas tanto por 4-aminopiridina como por una alta concentración de CIK, en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral (Barrie y cols. 1993). Estos resultados sugieren que el mecanismo de esta inhibición podría estar relacionado con una reducción en la entrada de Ca^{2+} como consecuencia directa de la activación de un receptor de adenosina acoplado a proteína G, (Dolphin y Prestwich 1985, Stone 1991) más que con la apertura de los canales de K^{+} (Zoltay y Cooper 1991).

El GABA y el agonista baclofen inhiben la liberación de glutamato a través de la activación de receptores tipo B (Dolphin y Scott 1987, Harrison 1990, Klapstein y Colmers 1992). Por otro lado, las dinorfinas son péptidos que se encuentran en elevadas concentraciones en algunas terminaciones sinápticas glutamatérgicas del

hipocampo almacenadas en vesículas sinápticas grandes (Terrian y cols. 1988), y que se liberan al espacio sináptico por un proceso dependiente de Ca^{2+} , (Terrian y cols. 1988, Terrian y cols. 1989) también inhibien la liberación de glutamato. El mecanismo de la acción inhibitoria de las dinorfinas no se conoce, pero de nuevo se sugiere una reducción en la entrada de Ca^{2+} .

4.2. Proteína quinasa C.

La proteína quinasa C, (PKC), es una quinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos, activada por el diacilglicerol generado por estimulación de algunos sistemas de transducción de señales de la membrana celular (Takai y cols 1979). El cerebro de los mamíferos contiene altas concentraciones de proteína quinasa C y su activación, produce numerosos efectos en las neuronas como son: cambios en el desarrollo neuronal, modulación de la liberación de neurotransmisores, modificación de canales iónicos y cambios en la plasticidad sináptica (Nishizuka 1984, Nishizuka 1986). La proteína quinasa C es una familia de isoenzimas compuesta por 10 proteínas relacionadas (Nishizuka 1992) pudiendo considerarse desde el punto de vista estructural tres grupos. El grupo A está formado por los isoenzimas α , βI , βII y γ , que son activados por Ca^{2+} , fosfatidílerina y diacilglicerol ó ésteres de forbol, siendo esta activación incrementada en presencia de ácidos grasos insaturados y lisofosfatidílerina (Nishizuka 1992). El grupo B, está formado por los isoenzimas δ , ϵ , η y θ , que no requieren Ca^{2+} para su activación, pero si fosfatidílerina y diacilglicerol ó ésteres de forbol (Koide y cols. 1992). La subespecie ϵ es activada por ácidos grasos insaturados (Saito y cols. 1993). Por último, más recientemente se han identificado dos subespecies ξ y λ , que integran el grupo de la proteína quinasas C atípicas. Estas isoformas dependen para su activación de fosfatidílerina pero no de diacilglicerol ni de ésteres de forbol ni de Ca^{2+} (Ohno y cols. 1989). La subespecie ξ es, sin embargo, activada por los ácidos grasos insaturados.

La proteína quinasa C a nivel celular, se localiza tanto en el citosol como en las membranas, aunque sólo la proteína unida a las membranas parece ser funcional, ya que en ellas se encuentran los fosfolípidos y los diacilgliceroles que son los cofactores necesarios para su activación (Nishizuka 1984). El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular induce la redistribución de la proteína quinasa C del citosol a las membranas, donde la proteína se une a la fosfatidílerina formándose un complejo preactivo (Bell 1986). El diacilglicerol generado como respuesta a una

señal extracelular, interacciona con el complejo preactivo y activa a la proteína quinasa C (Ganong y cols. 1986). Los ésteres de forbol, que son unos potentes agentes tumorales, inducen también una rápida traslocación de la proteína quinasa C a la membrana, solo que en este caso, la traslocación suele ir seguida de la desaparición de la actividad enzimática de proteína quinasa C por un proceso de proteólisis mediado por proteasas dependientes de Ca^{2+} del tipo de las calpaínas (Takai y cols. 1977). La proteólisis de la proteína quinasa C por dichas proteínas genera una forma catalíticamente activa, denominada proteína quinasa M, PKM, que es soluble y activa en ausencia de Ca^{2+} y fosfolípidos. Las diferentes subespecies de proteína quinasa C muestran diferente sensibilidad a este proceso proteolítico, siendo las isoformas α y β más susceptibles que el isoenzima γ (Oda y cols. 1991). El significado fisiológico de este proceso no está bien establecido, pero podría formar parte de un sistema de degradación de la proteína quinasa C, finalizando las acciones generadas por el enzima.

El primer mecanismo descrito para la activación de la proteína quinasa C fue la hidrólisis de fosfatidilinositoles. La activación de receptores acoplados a esta vía de transducción de señales, genera IP_3 y diacilglicerol como segundos mensajeros. El IP_3 es capaz de inducir cambios en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} por movilización del Ca^{2+} almacenado en los compartimentos intracelulares (Berridge e Irvine 1989), mientras que el diacilglicerol activa a la proteína quinasa C. Más recientemente se ha observado que el diacilglicerol se puede generar también por hidrólisis de fosfatidilcolina por activación de la fosfolipasa D, con formación de ácido fosfatídico seguida de la hidrólisis de éste por la fosfohidrolasa (Nishizuka 1992). Además, algunas isoformas de la proteína quinasa C pueden ser activada por los ácidos grasos cis-insaturados, como el ácido oleico y el araquidónico (Murakami y Routtenberg 1985, Murakami y cols. 1986, Shearman y cols. 1991 b).

Estudios inmunocitoquímicos han mostrado la presencia de proteína quinasa C en las terminaciones nerviosas (Girard y cols. 1985). Aproximadamente un 50% de la actividad de la proteína quinasa C presente en la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral está asociada a membranas (Díaz-Guerra y cols. 1987). Existen diferencias respecto al contenido de las diferentes subespecies de proteína quinasa C en las terminaciones sinápticas de diferentes regiones cerebrales, así los sinaptosomas de corteza cerebral contienen las isoformas α , β , γ y ϵ (Shearman y cols. 1991, Saito y cols. 1993), mientras que los sinaptosomas de hipocampo contienen las isoformas α

y β (Shearman y cols. 1991). La existencia de la isoforma γ en esta preparación es más discutida, ya que si bien los estudios de Nishizuka en sinaptosomas de hipocampo, no detectan esta isoforma; en una fracción enriquecida de sinaptosomas de las fibras musgosas de hipocampo, se han encontrado con anticuerpos la presencia de las isoformas γ , ϵ y ζ (Terrian y cols. 1993), además de las mencionadas α y β .

La activación de la proteína quinasa C de la presinápsis aumenta la liberación dependiente de Ca^{2+} de una gran variedad de neurotransmisores como noradrenalina, (Nichols y cols. 1987), dopamina, (Shu y Selmanoff 1988), acetilcolina, (Tanaka y cols. 1986) y glutamato (Lynch y Bliss 1986, Barrie y cols. 1991). El mecanismo por el cual la proteína quinasa C potencia la liberación de neurotransmisores no se conoce en detalle por las dificultades que conlleva el estudio de los flujos iónicos y de la secreción acoplados a Ca^{2+} en las terminaciones nerviosas. Se ha sugerido, no obstante, que la proteína quinasa C puede mediar la modulación de la corriente de entrada de Ca^{2+} bien por una apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y acoplados a la secreción de neurotransmisores (De Reiramar y cols. 1985, Kaczmarck 1987, Strong y cols. 1987) ó bien por un bloqueo de canales de K^{+} (Colby y Blaustein 1988, Higashida y Brown 1986, Barrie y cols. 1991).

4.3. Fosfoproteínas implicadas en la liberación de neurotransmisores.

La despolarización de la terminación sináptica estimula la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis de neurotransmisores. En sinaptosomas, la entrada de Ca^{2+} activa una serie de proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} y de fosfatasa, que determinan unos cambios en el estado de fosforilación de ciertas proteínas, habiéndose sugerido la posibilidad de que estos cambios en el estado de fosforilación de las proteínas, podría estar directamente relacionado con el mecanismo molecular de la liberación del neurotransmisor.

Los sistemas de fosforilación más abundantes en las terminaciones sinápticas, relacionados a su vez con la liberación de neurotransmisores, son la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina tipo II (CAM-quinasa II), que fosforila a la sinapsina (Nichols y cols. 1990, De Camilli y cols. 1990), y la proteína quinasa C que fosforila las proteínas MARCKS (Albert y cols. 1987, Hartwing y cols. 1992) y B-50 ó GAP-43 (Aloyo y cols. 1983).

La proteína CAM-quinasa II se localiza tanto en las membranas como en el citosol de las terminaciones sinápticas donde se une a las proteínas del citoesqueleto y de las vesículas sinápticas. La unión del complejo Ca^{2+} -calmodulina separa los dominios autoinhibidor y catalítico de la quinasa, permitiendo la fosforilación de los sustratos, así como la autofosforilación de la quinasa. La autofosforilación de la treonina 286 dentro del dominio autoinhibidor tiene lugar segundos después de la activación de la quinasa y es responsable de la actividad fosforilante independiente de Ca^{2+} que se observa tras la disminución de los niveles de Ca^{2+} después de la despolarización (Patton y cols. 1990).

La sinapsinas I y II, como ya hemos señalado, son fosfoproteínas asociadas a vesículas sinápticas, que constituyen los sustratos fisiológicos de la proteína CAM-quinasa I que las fosforila en el residuo de serina próximo al grupo amino terminal. Además, la sinapsina I, pero no la II, es fosforilada también por la CAM-quinasa II (Huttner y Greengard 1979) lo que provoca una disminución de la afinidad de sinapsina I por las vesículas sinápticas, así como la desaparición de la interacción de la sinapsina con los filamentos de actina (Schiebler y cols. 1986, Benfenati y cols. 1989). En experimentos con sinaptosomas se ha demostrado que la introducción de la proteína CAM-quinasa II en las terminaciones sinápticas aumenta la liberación dependiente de Ca^{2+} de noradrenalina y glutamato inducidas por CIK (Nichols y cols. 1990). Además, el inhibidor selectivo de esta quinasa, isoquinoleno sulfonilo, KN 62, inhibe la liberación de glutamato (Sihra 1993). De acuerdo con estos resultados, se ha propuesto la hipótesis de que los efectos de la proteína CAM-quinasa II están mediados por la fosforilación de la sinapsina I, lo que resultaría en un debilitamiento de las interacciones de las vesículas sinápticas y los filamentos de actina, incrementando consiguientemente el número de vesículas disponibles para la exocitosis (De Camilli y Greengard 1986, Böhler y cols. 1990). Más recientemente se ha observado en sinaptosomas permeabilizados transitoriamente por congelación-descongelación, que la introducción de sinapsina I defosforilada, conlleva una disminución significativa de la liberación de glutamato. Por el contrario, la introducción de sinapsina I que había sido previamente fosforilada por la proteína CAM-quinasa II, incrementaba la liberación de glutamato (Nichols y cols. 1992). Estos resultados indicarían que la sinapsina I, es un componente importante en la regulación de la liberación de neurotransmisores.

La proteína B-50, conocida también como GAP-43, neuromodulina o proteína

F₁, es una proteína específica del sistema nervioso, que se expresa en altas cantidades en las neuronas durante el desarrollo neuronal y en procesos de regeneración, y que ha sido implicada también en procesos de aprendizaje y memoria así como en la liberación de neurotransmisores (Coggins y Zwiers 1991, De Graan y Gispen 1993). Esta proteína se encuentra fundamentalmente en las membranas de la terminaciones sinápticas, pero no en las dendritas (Gispen y cols. 1985). La proteína B-50 posee un único sitio de fosforilación por proteína quinasa C, y es considerada como una proteína que une calmodulina de forma atípica, ya que la afinidad por esta proteína es mayor en ausencia que en presencia de Ca²⁺ (De Graan y cols. 1992).

En base a su localización presináptica y al alto grado de correlación que existe entre la fosforilación de esta proteína y la liberación de neurotransmisores tras la activación de la proteína quinasa C, se ha sugerido que la proteína B-50 participa en el mecanismo molecular de la liberación de neurotransmisores (Dekker y cols. 1989, Dekker y cols. 1990). En este sentido, en experimentos realizados con sinaptosomas permeabilizados con estreptolisina-O, se ha observado que la aplicación de anticuerpos contra la proteína B-50, no solamente impide su fosforilación por proteína quinasa C sino que además inhibe la liberación de noradrenalina (Dekker y cols. 1989).

La activación de la proteína quinasa C fosforila una proteína miristoilada y rica en residuos de alanina y que además es un sustrato de la proteína quinasa C, conocida abreviadamente como MARCKS. MARCKS es una proteína que une calmodulina y actina in vitro (Hartwig y cols. 1992), y que es fosforilada en una gran variedad de tipos celulares en respuesta a factores de crecimiento, neurotransmisores y ésteres de forbol (Harrison y Mobley 1990). La fosforilación de MARCKS conlleva, en diversos tipos celulares, su traslocación desde la membrana al citosol (Wang y cols. 1989).

En experimentos con sinaptosomas se ha observado que la despolarización con una alta concentración de ClK, incrementa en un 30% el estado de fosforilación de MARCKS (Coffey y cols. 1993). Aunque no se ha demostrado de una manera directa un papel de MARCKS en la liberación de neurotransmisores, se ha sugerido que esta proteína, al igual que otras proteínas que unen calmodulina tal como la proteína B-50, podrían funcionar como reservorios de calmodulina, liberándola después de la activación de proteína quinasa C. Puesto que MARCKS en su forma defosforilada pero no en la fosforilada, se une a los filamentos de actina, se ha propuesto que la

activación de la proteína quinasa C, fosforilaría MARCKS favoreciendo el desensamblaje de los filamentos de actina (Graff y cols. 1989). Según estos principios, se podría predecir que la fosforilación de MARCKS contribuiría a la facilitación de la liberación de neurotransmisores, bien por la rotura de los filamentos de actina, bien, por el incremento en la concentración de calmodulina libre del citosol, donde la activación de las quinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina podría llevar a un incremento en la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, esta supuesta implicación de MARCKS en la liberación de neurotransmisores no ha sido corroborado en experimentos con sinaptosomas (Coffey y cols. 1993), donde se ha demostrado que la fosforilación de MARCKS no es un requerimiento absoluto para la liberación de glutamato, ya que en presencia del inhibidor de proteína quinasa C, RO-31-8220, activo frente a las isoformas de proteína quinasa C α , β_1 , β_{11} , y γ , aunque se inhibe totalmente la fosforilación de MARCKS inducida por la despolarización con CLK, no se afecta para nada la liberación de glutamato (Coffey y cols. 1993).

4.4. Ácido araquidónico.

Estudios realizados en los últimos años han sugerido que los ácidos grasos poli-insaturados, fundamentalmente, el ácido araquidónico y sus metabolitos, podrían constituir una nueva clase de segundos mensajeros (Piomelli y Greengard 1990, Ordaway y cols. 1991) con capacidad para modular la liberación de neurotransmisores. El ácido araquidónico que se encuentra normalmente esterificado, formando parte de los fosfolípidos de la membrana plasmática, se genera en respuesta a la estimulación de determinados receptores acoplados a la fosfolipasa A_2 (Felder y cols. 1990). El glutamato, a través de la activación de los receptores NMDA y metabotrópico, también estimula la formación y liberación de ácido araquidónico (Dumuis y cols. 1988, Aramori y Nakanishi 1992). El ácido araquidónico se puede formar también a partir de diacilglicerol originado por la hidrólisis del fosfatidilinositol por la fosfolipasa C y posterior hidrólisis de éste por acción de una diacilglicerol lipasa (Irvine 1982). El ácido araquidónico tiene una vida muy corta, ya que rápidamente es metabolizado a productos oxigenados por distintos sistemas enzimáticos como el de la cicloxigenasa, la lipoxigenasa y la monoxigenasa (Shimizu y Wolfe 1990). La vía de la 12-lipooxigenasa es el sistema enzimático más importante del tejido nervioso para el metabolismo del ácido araquidónico (Shimizu y cols. 1987), formándose distintos metabolitos como el ácido 12s-hidroperoxi-eicosatetranoico (12-HPETE) y el ácido 12-s-hidroxi-eicosatetranoico (12-HETE).

En relación con los efectos del ácido araquidónico sobre la liberación de neurotransmisores, algunos estudios han demostrado que el ácido araquidónico y/o sus metabolitos inhiben la liberación de serotonina, en las neuronas del molusco *Aplysia Californica* (Piomelli y cols. 1987 a, Buttner y cols. 1989), de catecolaminas en las células cromafines (Ehrenrguber y Zahler 1991) y de glutamato en sinaptosomas de hipocampo (Freeman y cols. 1991). Sin embargo, en otros experimentos se ha observado que el ácido araquidónico a elevadas concentraciones incrementa la liberación de glutamato (Lynch y Voss 1990, Freeman y cols. 1991).

El mecanismo por el cual el ácido araquidónico y/o sus metabolitos modulan la secreción de neurotransmisores no se ha establecido en detalle, aunque se ha sugerido que estos lípidos podrían modular la actividad de canales iónicos (Ordway y cols. 1991). Datos electrofisiológicos obtenidos en las células de la musculatura lisa gástrica (Ordway y cols. 1989), en células atriales del corazón (Kim y cols. 1989), en neuronas de *Aplysia* (Buttner y cols. 1989) y en cultivos neuronales de hipocampo (Premkumar y cols. 1991) han demostrado que el ácido araquidónico incrementa la permeabilidad al ion K^+ ó bien disminuyen la entrada de Ca^{2+} (Keyser y Alger 1990), reduciendo de este modo, la excitabilidad celular. Esta modulación por parte del ácido araquidónico y/o sus metabolitos sobre la actividad de los canales iónicos podría ser el resultado de una acción directa del ácido graso sobre el canal iónico (Buttner y cols. 1989) ó bien, consecuencia de la activación por parte del ácido graso de proteínas quinasas como la proteína quinasa C (Linden y Routtenberg 1989) o quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina tipo II (CAMkinasa-II) (Piomelli y cols. 1989), con efectos posteriores en la liberación de neurotransmisores.

Por otro lado, se ha observado que los ácidos grasos inhiben el co-transportador de Na^+ -glutamato de la membrana plasmática (Rhoads y cols. 1983, Yu y cols. 1987, Volterra y cols. 1992). Esta acción inhibidora del ácido araquidónico sobre la actividad del transportador de glutamato podría facilitar la acumulación de glutamato en el medio extracelular lo que podría no sólo aumentar la eficacia de las sinapsis glutamatérgicas sino que también podría contribuir a las acciones neurotóxicas de este neurotransmisor (Barbour y cols. 1989).

OBJETIVOS.

- 1- Investigar las acciones de la activación de la proteína quinasa C presináptica con ésteres de forbol en la liberación de glutamato en las terminaciones sinápticas aisladas de la corteza cerebral de rata, así como en otros parámetros bioenergéticos relacionados con la secreción.
- 2- Estudiar el papel del ácido araquidónico y/o sus metabolitos en la exocitosis de glutamato con el fin de establecer el mecanismo de la acción moduladora.
- 3- Identificar las señales extracelulares, que acopladas al metabolismo de fosfatidilinosítoles y a la generación de diacilglicerol, activan la vía facilitadora de la liberación de glutamato mediada por proteína quinasa C. Una vez identificada la señal extracelular se estudiará los efectos de agonistas y antagonistas de este receptor en la exocitosis de glutamato y los parámetros relacionados.

El conocimiento de las vías de modulación de la exocitosis de glutamato, de las señales extracelulares implicadas, de los receptores presinápticos, así como mecanismos de transducción de la señal y de los segundos mensajeros podría ser de gran interés para acceder a la modulación farmacológica de estas sinapsis glutamatérgicas.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL

1.1. Reactivos y Productos químicos.

Los productos que no se detallan a continuación (ácidos, álcalis, sales inorgánicas y disolventes orgánicos) eran todos de grado analítico y de elevada pureza, y fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania) o Sigma (Co; St. Louis; M.O., USA).

La glutamato deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.3), el NADP⁺, el NADH, el L-glutamato, la fosfatidilserina, la histona H₁, el β -forbol 12-13-dibutirato (4 β -PDBu), el β -forbol 12-miristoil 13 acetato (PMA), el α -forbol 12,13-didecanoato (4 α -PDD), el 1,3-dioctanoilglicerol, la 1,3-dioleína, el oleil-acetilglicerol, el ácido araquidónico, el metilaraquidonato y demás ácidos grasos fueron suministrados por Sigma (Co, St. Louis; M.O., USA), al igual que la albúmina de suero bovino (BSA), el ATP, la 4-aminopiridina, la veratridina, el ditioneitol, la piruvato quinasa (E.C. 2.7.1.40), el fosfoenolpiruvato, el EGTA, el TEA y TES.

La D(+)-Glucosa, el EDTA y el PIPES fueron suministrados por la marca MERCK (Darmstadt, Alemania).

La sacarosa fué de Merck y de BDH. Limited, Pool (Inglaterra).

La estaurosporina y el HEPES fueron suministrados por Boehringer Corp. (Manheim, Alemania).

La sn-1,2-diacilglicerol quinasa (E.C. No. 2.7.1.107) y la ionomicina fue de Calbiochem (San Diego, Co, USA).

El fura 2-AM y el yoduro de 3',3' dietil-tio-carbociamida, DiSC₂(5) fueron suministrados por Molecular Probes (Eugene, USA).

La luciferasa (E.C. 1.13.12.7) fue de LKB (Suecia).

El isótopo radiactivo [³²P]ATP fué suministrado por Amersham International p/c (Inglaterra) y el líquido de centelleo por Beckman Instruments (Ca, USA).

Los ácidos (1S,3R) y (1R,1S) amino-ciclopentíl-dicarboxílico (1S,3R) ó (1R,3S)ACPD, el ácido 2-amino-3 fosfopropiónico (L-AP3), el ácido 2-amino-3 fosfonobutírico (L-AP4), el ácido D-amino-5-fosfopentanoico (D-AP5), 6-ciano-7-nitroquinoxalín-2,3 diona (CNQX), ibotenato y quisqualato fueron suministrados por Tocris Neuramin (Essex, Inglaterra).

El ficoll 400 fue suministrado por Pharmacia (Uppsala, Suecia) y se dializó con agua desionizada durante cinco ó seis horas, con cambio de agua cada hora. La concentración final del ficoll se estableció calculando su peso específico.

La enzima glutamato deshidrogenasa se dializó en un medio constituido por fosfato sódico 100 mM y glicerol al 50%, pH=7,3, bajo presión en atmósfera de N₂ durante doce a veinticuatro horas para eliminar el glutamato contaminante. La diálisis se llevó a cabo en una célula de ultrafiltración AMICON con membranas XM 100 de Amicon (Amicon Co; Danvers, M.A., Irlanda) que retiene moléculas con un peso molecular superior a 100.000 daltons.

1.2. APARATOS.

Se utilizaron balanzas de precisión AND ER-60 A y granatarios AND de los modelos FX 2000 y EW 300A.

Las soluciones fueron agitadas con agitadores magnéticos S y agitadores orbitales Luckham 802. Todas las medidas de pH se realizaron con los pHmetros Metrohm 654 y Crison 2001.

Las centrifugas que se emplearon fueron las siguientes: centrífuga refrigerada Heareus modelo 2.0 RS, centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC5C, ultracentrífuga Beckman modelo L8-M y microfugas eppendorff modelos Beckman 11 y Sigma 201M.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en los espectrofotómetros Beckman modelo DU-40 y Pharmacia Ultrospec III.

Las incubaciones que requirieron determinadas condiciones de temperatura se realizaron en baños termostatzados modelos Unitronic 320 OR con agitación orbital y

Tectron 3473100.

La luminiscencia se midió con un luminómetro LKB modelo 1250.

Las determinaciones radiométricas se realizaron en contadores de centelleo líquido Beckman modelos LS 3801 y LS 6000IC.

La determinaciones de la liberación del neurotransmisor glutamato, medidas de Ca^{2+} intracelular y del potencial de membrana se realizaron en un fluorímetro Perkin-Elmer, modelo LS 50 controlado por un ordenador Epson AX-2 y con un baño termostatzado, modelo Braun Frigomix U.

1.3. MATERIAL BIOLOGICO.

En todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la raza Wistar, 200-250 gramos de peso, suministradas por la casa Charles-Rives a través de Panlab (Barcelona).

2. METODOS.

2.1. Obtención de los sinaptosomas.

2.1.1. Gradientes de Ficoll.

Los sinaptosomas se purificaron en un gradiente discontinuo de Ficoll-Sacarosa según la técnica descrita por Nicholls (1978) y Scott y Nicholls (1980) como se resume en el esquema 4. En todos los experimentos se sacrificaron dos ratas por dislocación cervical y decapitación. El cerebro se lavó rápidamente con medio de aislamiento (Sacarosa 0,32 M, TES 5 mM y EDTA 0,5 mM, pH= 7,4) y se diseccionó la corteza cerebral. A continuación esta región cerebral se homogeneizó en un homogenizador modelo Potter con vástago de teflón, con siete pasos completos de homogenización. El homogenado resultante se centrifugó a 900 xg durante 5 minutos a 4°C, recogándose el sobrenadante. Con el fin de aumentar el rendimiento de la preparación, el sedimento se resuspendió en medio de aislamiento y se centrifugó en las condiciones anteriormente citadas. Los dos sobrenadantes obtenidos se centrifugaron a 17.000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sedimento resultante, denominado sinaptosomas crudos o sedimento P₂ se resuspendió en 10 ml de medio de

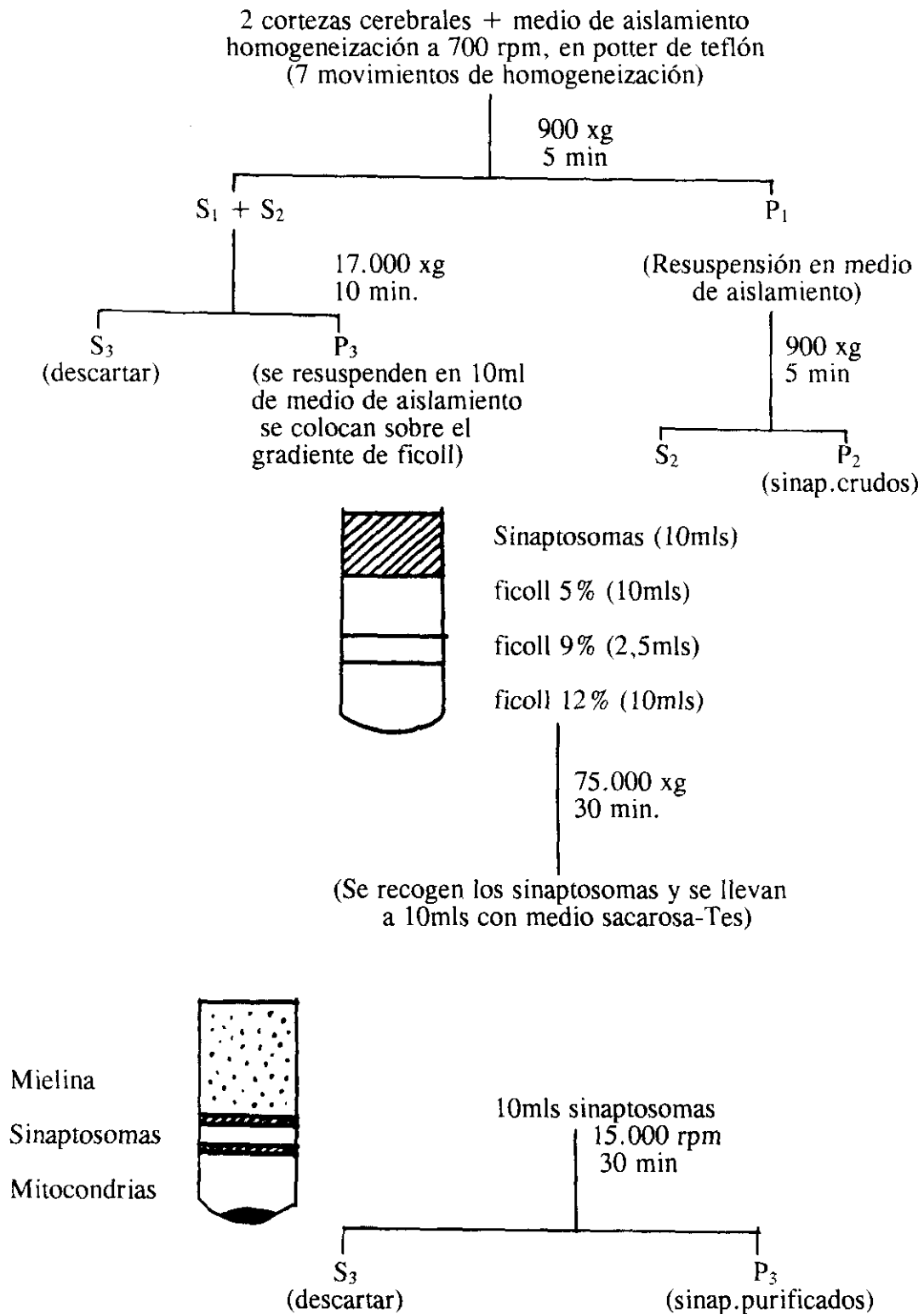
aislamiento y se colocó sobre un gradiente discontinuo de ficoll preparado en medio de aislamiento y formado por 10 mls de ficoll al 12%, 2,5 mls de ficoll al 9% y 10 mls de ficoll al 5%, centrifugándose a 75.000 xg durante 30 minutos a 4°C. Los sinaptosomas sedimentaron en dos bandas, la primera entre el ficoll 12%-9% y la segunda entre el ficoll 9%-5%. La mielina se separó en la banda superior correspondiente al ficoll 5% y las mitocondrias quedaron en el fondo del tubo. Con una pipeta pasteur se recogieron los sinaptosomas y se diluyeron hasta un volumen final de 10 ml de un medio sacarosa-TES (sacarosa 250 mM y TES 5 mM a pH=7,4). A continuación, se determinaron proteínas por el método de Biuret y se tomaron alícuotas de un 1 ó 5 mg de sinaptosomas según el ensayo a realizar. El volumen final se completó hasta 2 o 3 mls con el medio sacarosa-TES y se centrifugó a 25.000 xg durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y los sinaptosomas sedimentados en el fondo del tubo se conservaron en un baño de hielo entre 5 y 6 horas.

En algunos experimentos se emplearon sinaptosomas crudos correspondientes al sedimento P₂. Estos sinaptosomas se compararon con los sinaptosomas purificados por gradientes de Ficoll, no encontrándose diferencias cualitativas en lo que se refiere a la liberación de glutamato y a la homeostasis del calcio.

2.1.2. Gradientes de Percoll.

Los sinaptosomas se purificaron en un gradiente discontinuo de Percoll según la técnica descrita por Dunkley y cols. (1986) y Wang y cols. (1989). En todos los experimentos se sacrificaron dos ratas por dislocación cervical y decapitación. El cerebro se lavó con un medio compuesto por sacarosa 0,32 M a pH=7.4 y se diseccionó la corteza cerebral. A continuación esta región cerebral se homogeneizó en un homogenizador modelo Potter con vástago de teflón, con ocho pasos completos de homogenización. El homogenado resultante se centrifugó a 2000 xg durante 2 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante que se dividió en dos tubos y se centrifugó de nuevo a 9.500 xg durante 12 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron y cada sedimento se resuspendió en 8mls del medio anteriormente descrito y se colocó sobre un gradiente discontinuo de percoll preparado en un medio compuesto por sacarosa 0,32M, EDTA 1.0mM y DTT 0,25mM y formado por 3mls de percoll al 23%, 3mls de percoll al 10% y 3mls de percoll al 3%, pH=7.4, centrifugándose a 25.000 xg durante 10 minutos a 4°C. Los sinaptosomas sedimentaron en la banda situada entre

Esquema 4.- Obtención de sinaptosomas purificados por gradiente discontinuo de ficoll.

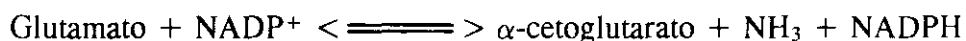


el percoll 23%-10%. La mielina se separó en la banda situada entre el percoll 3%-10% y las mitocondrias se quedaron en el fondo del tubo. Con una pipeta pasteur se recogieron los sinaptosomas y se diluyeron hasta un volumen final de 15 mls de un medio HBM (NaCl 140mM, ClK 5mM, NaHCO₃ 5mM, NaH₂PO₄ 1.2mM, MgCl₂ 1mM, Glucosa 10mM y Hepes 10mM, pH=7.4), centrifugándose a continuación a 22.000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en 8mls de medio HBM y a continuación se determinaron proteínas por el método de Biuret. Se tomaron alícuotas de 1mg de sinaptosomas y el volumen final se completó hasta 5mls con el medio HBM y se centrifugó a 3.000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y los sinaptosomas sedimentados en el fondo del tubo se conservaron en un baño de hielo entre 5 y 6 horas.

2.2. Determinación de la liberación de glutamato.

Se realizó según la técnica descrita por Nicholls y cols. (1987); el glutamato liberado se determinó mediante la reacción catalizada por el enzima glutamato deshidrogenasa en presencia de NADP⁺ como cofactor y midiendo el incremento de la fluorescencia que se produce por la formación de NADPH. Las variaciones de fluorescencia se registraron a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 340 nm y 460 nm respectivamente, y las rendijas de excitación y emisión se fijaron en 15 y 20 nm, respectivamente.

GDH



1 mg de sinaptosomas se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliots (NaCl 122mM, KCl 3,1mM, KH₂PO₄ 0,4mM, NaHCO₃ 5mM, MgSO₄ 1,2mM, TES-Na 20mM y glucosa 10mM, pH=7.4) que contenía también albúmina de suero bovino (BSA) 16 μM y se preincubaron a 37°C durante 60 minutos en un baño con agitación. A continuación, una alícuota de 1 ml de la suspensión se transfirió a una cubeta del fluorímetro Perkin-Elmer LS-50 que contenía NADP⁺ 1 mM y Cl₂Ca 1,33mM o bien una mezcla de calcio-EGTA (38μM Cl₂Ca y EGTA 50μM) que proporciona una concentración extracelular de calcio libre de 200 nM aproximadamente, según Verhage y cols. (1989). El ensayo se inició con la adición de 50 unidades de glutamato dehidrogenasa, observándose un incremento en la fluorescencia que se

corresponde al glutamato extrasinaptosomal y una vez estabilizada la señal fluorescente, se observa un incremento lento pero continuo, que se debe a la liberación basal (figura 1). La liberación de glutamato se inició por despolarización con 4-AP o ClK y la señal fluorescente resultante se registró durante 6 minutos más. Como la reacción catalizada por la glutamato dehidrogenasa es reversible, no existe linealidad entre el incremento en fluorescencia y la cantidad de glutamato ensayada, por ello, al final de cada ensayo, se añadió un patrón de 2 nmoles de glutamato para cuantificar el glutamato liberado. En algunos ensayos se añadió Tritón X-100 al 0.4% vol/vol para romper los sinaptosomas y determinar el contenido total de glutamato (Figura 1).

Los datos se recogieron cada segundo y los cálculos del glutamato liberado por miligramo de proteína, se realizaron en una hoja de cálculo, Lotus 123. La liberación dependiente de Ca^{2+} se calculó restando la liberación obtenida a una concentración de Ca^{2+} libre de 200 nM de la liberación obtenida a una concentración de Cl_2Ca de 1.33 mM.

En los ensayos en los que se analizó el efecto del ácido araquidónico en la liberación de glutamato y con el fin de evitar el efecto inhibitorio que ejercen los ácidos grasos endógenos liberados durante la incubación de los sinaptosomas, éstos se preincubaron durante 1 hora en un medio Elliots con albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos. Seguidamente, la suspensión se recogió y se centrifugó a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron en un medio Elliots sin BSA. Una alícuota de 1ml de esta suspensión se transfirió a una cubeta del fluorímetro y se procedió al ensayo de liberación anteriormente descrito.

2.3. Determinación del glutamato extrasinaptosomal.

La determinación de la concentración de glutamato extrasinaptosomal se realizó como medida de la actividad del transportador de glutamato, para estudiar la acción de posibles inhibidores de este transportador. Los sinaptosomas se resuspendieron en medio Elliots sin BSA (0,67mg/ml) y se incubaron en un baño con agitación a 37°C. A los dos minutos de la incubación se añadió Cl_2Ca 1,33mM y un minuto más tarde se añadieron los distintos agentes y se tomaron alícuotas de 250µls de la suspensión. A continuación, la suspensión de sinaptosomas se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto, recogiendo los sobrenadantes que se conservaron a -80°C para la determinación posterior de la concentración de glutamato.

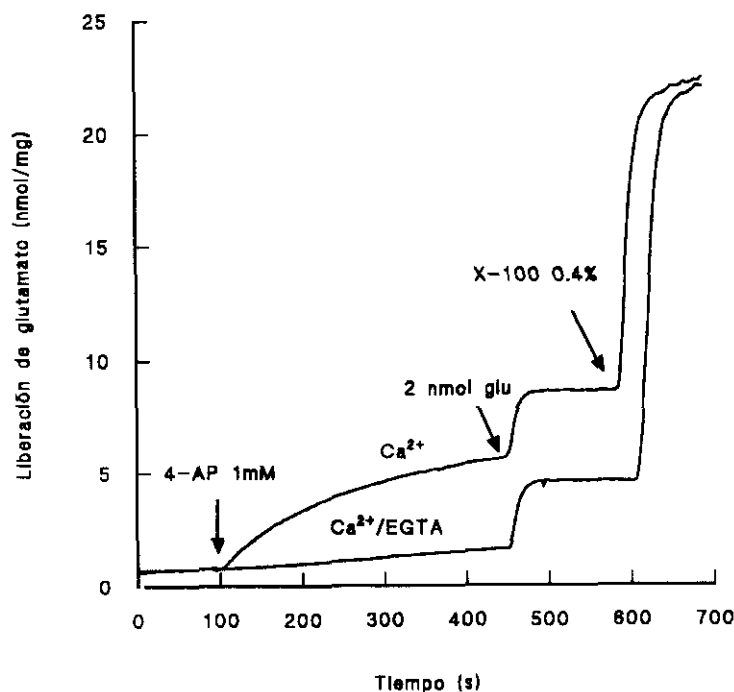


Figura 1. Ensayo típico de liberación de glutamato.

El contenido de glutamato se determinó adicionando 50 μ ls de muestra a una cubeta que contenía 1,2mls de medio Elliotts con NADP⁺ 1mM y 60 unidades de glutamato dehidrogenasa. El incremento de la señal fluorescente se registró durante 2 minutos y se cuantificó por comparación con el incremento producido por un patrón de 1 nmol de glutamato que se añadió seguidamente. La concentración extracelular de glutamato se calculó en nmoles de glutamato/ml de muestra.

2.4. Determinación de la concentración intracelular de Ca²⁺ libre.

La concentración intrasinaptosomal de Ca²⁺ libre se determinó con la sonda fluorescente Fura-2 según la técnica de Grynkiewicz y cols (1985). El fura-2 es un polianión muy hidrofílico que une Ca²⁺ específicamente, formándose un complejo Ca²⁺-Fura que da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se registra a una longitud de onda de 510 nm, produciéndose también un desplazamiento del espectro de excitación el U.V. que cambia el máximo de 380 a 340 nm. En los ensayos se utilizó el derivado acetoxi-metilado, fura 2-AM que es lo suficientemente lipofílico

para atravesar la membrana plasmática y alcanzar el interior celular donde las esterasas citosólicas rompen el enlace éster y liberan fura-2 que queda atrapado en el citosol donde actúa como sonda fluorescente para la medida de los niveles de Ca^{2+} , tras ser excitado a 340 y 360 nm, y leída su fluorescencia a 510 nm. Como nuestro equipo de fluorimetría tardaba unos 7 segundos en realizar el cambio de 340 a 360 nm, y nosotros queríamos obtener datos cada 0.5 segundos, la determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se realizó excitando a una única longitud de onda, 340 nm y realizando siempre al final de cada ensayo, la calibración.

1 mg de sinaptosomas se resuspendieron en 0.5mls de medio Elliots pH = 7,4 y se incubaron en un baño con agitación. A los cinco minutos de la preincubación se añadió Cl_2Ca 1,33mM y fura 2-AM 5 μM y la incubación se prosiguió por 30 minutos. Tras la incubación, la suspensión se lavó por centrifugación a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendió en medio Elliots (0,67 mg sinaptosomas/ml). Una alícuota de 1 ml de esta suspensión se transfirió a una cubeta del fluorímetro Perkin-Elmer LS-50 ajustado a 340 nm de excitación y 510 nm de emisión. El ensayo se inició con la adición de Cl_2Ca 1,33mM y una vez estabilizada la señal, se añadieron los distintos ligandos según el ensayo a realizar y finalmente, los sinaptosomas se despolarizaron con 4-AP o KCl.

Para determinar la posible contribución del fura extrasinaptosomal a la señal fluorescente así como a las señales mínimas y máximas, todos los ensayos se terminaron con el siguiente protocolo. La contaminación de fura extrasinaptosomal se estimó por la disminución de la fluorescencia observada tras la adición de EGTA 7,5 mM y TRIS 45 mM, pH=8. En aquellos experimentos en que la disminución de la señal fue significativa, ésta se restó a todo el registro. La señal de fluorescencia mínima se obtuvo al romper los sinaptosomas tras la adición del detergente SDS al 0,2% en ausencia de Ca^{2+} mientras que la señal de fluorescencia máxima se obtuvo al añadir un exceso de Cl_2Ca .

Los datos se recogieron con intervalos de 2 segundos y la concentración de calcio intracelular se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times \frac{F_t - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F_t}$$

donde F_t es la fluorescencia a cada tiempo y F_{min} y F_{max} son las fluorescencias mínima y máxima, respectivamente. Se utilizó una constante de disociación para el complejo Ca-Fura, K_d 224 nM según Grynkiewicz y cols. (1985) y los cálculos de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} libre se realizaron en una hoja de cálculo, Lotus 123.

2.5. Determinación del potencial de membrana sinaptosomal.

El potencial de membrana plasmática se determinó con la sonda fluorescente yoduro de 3',3' dietil-tio-carbocianida, DiSC₂(5) según la técnica descrita por Sims y cols. (1974). El DiSC₂(5) es un catión lipofílico que se acumula en el interior de los orgánulos cargados negativamente formándose dímeros cuando se alcanza concentraciones elevadas en el interior celular, con la consiguiente disminución de la señal fluorescente. La despolarización de la membrana plasmática desencadena su salida al exterior y un aumento en la emisión fluorescente a una longitud de onda de 680 nm tras ser excitado a 643 nm. Una acumulación excesiva de este indicador fluorescente en el interior de las mitocondrias, puede inhibir tanto el enzima NADH deshidrogenasa como el transporte de ADP, afectándose la fosforilación oxidativa con la consiguiente disminución en los niveles de ATP. Para evitar este problema, los experimentos se realizaron empleando una baja concentración de DiSC₂(5) (5 μ M) y las incubaciones con los sinaptosomas nunca fueron superiores a 5 minutos.

1mg de sinaptosomas se resuspendieron en medio Elliots con BSA (0,67 mg proteína/ml) y se incubaron a 37° durante una hora en un baño con agitación. Seguidamente, una alícuota de 1 ml se transfirió a una cubeta del fluorímetro Perkin-Elmer LS-50 ajustado a 643 nm de emisión y 680 nm de emisión, que contenía 5 μ M DiSC₂(5) y 1,33mM Cl₂Ca. Una vez estabilizada la señal, se añadieron los distintos ligandos según el ensayo a realizar. La despolarización de los sinaptosomas con 4AP ó KCl se registró como un aumento en la señal fluorescente que se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia.

Los datos se recogieron con intervalos de 1 segundo y los cálculos se realizaron en una hoja de cálculo, Lotus 123.

2.6. Determinación de la actividad de la proteína quinasa C.

Los sinaptosomas se resuspendieron en medio Elliots con BSA (0,67 mg proteína/ml) y se incubaron en un baño termostatzado a 37°C con agitación. A los cinco minutos de incubación se añadió Cl_2Ca 1,33mM y un minuto más tarde se procedió a la adición de los efectores. Se recogieron alícuotas a los tiempos establecidos (2mg de proteína) y se centrifugaron a 12.000 xg durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y los sedimentos se conservaron a -80°.

Para la extracción de la actividad de la proteína quinasa C, los sedimentos de sinaptosomas se resuspendieron en 0,5 mls de medio de homogenización (20 mM Pipes, EDTA 1mM, EGTA 1mM y β -mercaptoetanol 5 mM, pH=6,6) en presencia de los inhibidores de proteasas, leupeptina 20 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 1 mM y del detergente Nonidet P-40 al 0.1%, que extrae la proteína quinasa C unida a membranas. La suspensión de sinaptosomas se agitó vigorosamente y se mantuvo en hielo a 4°C durante 30 minutos. A continuación las muestras se diluyeron hasta 2 ml con medio de homogenización sin Nonidet P-40, agitándose de nuevo, y se centrifugaron a 145.000 xg durante 30 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante que se utilizó para la medida de la actividad de la proteína quinasa C.

La actividad de la proteína quinasa C se midió determinando el ^{32}P incorporado a partir de [^{32}P]ATP en la histona H_1 según el método descrito por Díaz-Guerra y cols. (1987). Se ensayaron 5 μls de muestra en un volumen final de 170 μls que contenía Hepes 20mM (pH= 7,5), acetato magnésico 1mM, β -mercaptoetanol 5mM, histona 50 μg , Cl_2Ca 0,7mM, 10 μg de fosfatidíserina y 0,5 μg de oleil-acetilglicerol. La reacción se inició con la adición de [$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP] 0,3 μCi . La fosforilación basal se determinó en un medio de composición similar pero en ausencia de fosfatidíserina y oleil-acetilglicerol que además contenía EGTA 1,77mM en lugar de Cl_2Ca . La reacción se mantuvo durante 20 minutos a 30°C y se detuvo al adicionar 2 ml de ácido tricloroacético al 5% con ácido fosfórico 10 mM a 4°. La radioactividad se recogió sobre filtros de fibra de vidrio GF/C de Whatman, que se lavaron tres veces con 3 mls de ácido tricloroacético en una bomba de vacío Millipore. Finalmente, los filtros se secaron durante 10-20 minutos a 100°C y su radioactividad se cuantificó en viales con 2 ml de líquido de centelleo.

La actividad de la PKC se expresó como la diferencia entre la incorporación de

^{32}P en presencia y ausencia de lípidos y calcio, definiendo como unidad de actividad de PKC como la cantidad de enzima que incorpora un nmol de fosfato en la histona H_1 por minuto.

La fosfatidilserina y el oleil-acetilglicerol se disolvieron en una mezcla cloroformo-metanol (19:1) (vol/vol) y se conservaron en stock a -20° como solución madre a la concentración de 2mg/ml y 0,8 mg/ml, respectivamente. Para realizar el ensayo, se tomaron alícuotas y el disolvente se evaporó insuflando N_2 . Los lípidos se disolvieron en el medio de incubación (excepto histona) y la disolución se sonicó.

2.7. Efectos del pretratamiento de los sinaptosomas con ésteres de forbol en la actividad de la proteína quinasa C.

La incubación de los sinaptosomas con altas concentraciones de ésteres de forbol, produce una rápida disminución de la actividad de la proteína quinasa C, estimada por la pérdida de su capacidad para fosforilar el sustrato exógeno Histona H_1 (Díaz-Guerra y cols. 1987, Oda y cols. 1991). Una posible explicación a esta pérdida de actividad es su traslocación seguida de la proteólisis de la proteína quinasa C por proteasas tipo calpainas (Takai y cols. 1977). Por ello, el pretratamiento de los sinaptosomas con ésteres de forbol se ha utilizado para determinar la influencia de la pérdida de una gran parte de la actividad de la proteína quinasa C, en la capacidad de los sinaptosomas para liberar glutamato y así poder establecer en que medida la proteína quinasa C está involucrada en el proceso.

Los sinaptosomas de resuspendieron en un medio Elliotts con BSA (0,67 mg proteína/ml) y se incubaron en un baño termostatzado a 30° con agitación. A los 5 minutos de la incubación se añadió Cl_2Ca 1,33 mM y un minuto más tarde PMA 1 μM . Transcurridos 30 minutos, la incubación se detuvo al colocar los tubos en hielo, centrifugándose las muestras a continuación a 17.000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y los sedimentos se conservaron en hielo a 4°C . En los experimentos control, se procedió de la misma manera, pero utilizando el éster de forbol inactivo $4\alpha\text{-PDD}$, en lugar de PMA.

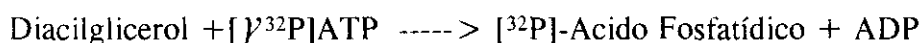
A continuación, los sinaptosomas se trataron de acuerdo a dos protocolos distintos, según que se quisiera determinar la actividad residual de la proteína quinasa C ó la capacidad de los sinaptosomas para liberar glutamato. En el primer caso, se

procedió a la extracción de la actividad de la proteína quinasa C total con el detergente Nonidet P-40 como se describe en el apartado anterior y seguidamente se determinó la actividad de la proteína quinasa C. En el segundo caso, los sinaptosomas se resuspendieron en medio Elliots con BSA, pH= 7,4 (0,67 mg proteína/ml). Se preincubaron a 37°C durante 30 minutos en un baño con agitación y la suspensión se lavó por centrifugación a 12.000 xg durante un minuto, resuspendiéndose en medio Elliots sin BSA. Una alícuota de 1 ml (0,67 mg proteína/ml) se transfirió a una cubeta del fluorímetro y se procedió al ensayo de liberación anteriormente descrito en el apartado 2.2. de Métodos.

2.8. Determinación de diacilglicerol.

La concentración intrasinaptosomal de diacilglicerol se determinó según el método descrito por Loomis y cols. (1985) que está basado en la producción de ácido fosfatídico a partir del diacilglicerol presente en los sinaptosomas en presencia de [γ ³²P]-ATP, según la reacción:

DAG-K



Los sinaptosomas se resuspendieron en medio Elliots sin BSA (0,67mg/ ml) y se incubaron a 37°C en un baño termostatzado. A los 2 minutos se añadió Cl₂Ca 1,33mM y 1 minuto más tarde se añadieron los distintos efectores. Se recogieron alícuotas de 0,5mls a los tiempos establecidos y las reacciones se pararon con 0,5mls de una mezcla orgánica de cloroformo/metanol (95:5). Las muestras se agitaron fuertemente y se congelaron a -80°C. Tras la descongelación y agitación, las muestras se centrifugaron a 10.000 xg durante 1 minuto a 4°C, recogándose la fase orgánica (inferior). El solvente orgánico se evaporó a 70°C y el residuo sólido se resuspendió con 50 μ ls de medio A (Pipes 50mM, NaCl 100mM, β -mercaptoetanol 5 μ M , MgCl 50mM, Nonidet P-40 1% y fosfatidilserina 0,2mg/ml, pH= 6,8), incubándose a 30°C durante 5 minutos. La reacción se inició con la adición de 50 μ ls de medio B (ATP 50 μ M, diacilglicerol quinasa 1U, [⁻³²P] ATP 0,1 μ Ci y 20 μ ls de medio A/ensayo). La reacción continuó durante 60 minutos a 30°C con agitación y se paró con 100 μ ls de medio C (PCA 5%, ATP 10mM y H₃PO₄ 1mM). El ³²P-ácido fosfatídico formado se extrajo mediante agitación vigorosa con 0.7mls de mezcla orgánica cloroformo-metanol, recogándose alícuotas de 500 μ ls de la fase orgánica

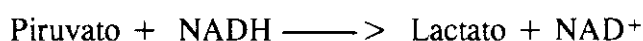
(inferior) que contenía la radioactividad. Las muestras se evaporaron a 70°C y la radiactividad se midió con 1,5mls de líquido de centelleo.

Paralelamente se preparó una curva patrón desde 0.4 a 1.6 μ M de dioctanoilglicerol, procediéndose de la misma manera que con las muestras problemas. La concentración de dioctanoilglicerol se expresó en pmoles/mg de proteína.

2.9. Determinación de la actividad del enzima láctico deshidrogenasa.

La actividad del enzima láctico deshidrogenasa, LDH se utilizó como un marcador de la integridad de los sinaptosomas. En estos ensayos se determinó la salida de LDH sinaptosomal al medio de incubación, como índice de rotura de los sinaptosomas.

La medida de la actividad láctico deshidrogenasa, enzima marcador de la fracción citosólica se realizó según la técnica descrita por Lai y col. (1976), midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm por desaparición de NADH según la reacción:



1 mg de sinaptosomas se resuspendieron en medio Elliots con BSA (0,67 mg/ml) y se incubaron a 37° durante una hora en un baño con agitación. Seguidamente, la suspensión se recogió y se centrifugó a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendió en un medio Elliots sin BSA y se añadieron el ácido araquidónico a las concentraciones indicadas. Una alícuota de 50 μ ls de esta suspensión se transfirió a una cubeta que contenía tampón fosfato potásico 50mM pH=7,4 añadiéndose NADH 0,2mM, Triton X-100 al 0.5% e iniciándose la reacción con la adición de piruvato 1mM. En el espectrofotómetro se registró la disminución de la absorbancia en función del tiempo y la actividad enzimática se expresó como % de la actividad total determinada en presencia de Tritón X-100 al 0.5%, considerando un coeficiente de extinción (ϵ) para el NADH de 6,22 10³ M⁻¹ cm⁻¹.

2.10. Determinación de los nucleótidos de ATP y ADP.

Los sinaptosomas, en presencia de sustratos oxidables como la glucosa o el piruvato, mantienen un elevado índice de ATP/ADP en condiciones aeróbicas (Kauppinen y Nicholls 1986), por ello, el contenido sinaptosomal de ATP y ADP se utilizó como un marcador de la integridad metabólica de los sinaptosomas durante las incubaciones en presencia de ácidos grasos. Los niveles de ATP y ADP se determinaron según el método descrito por Kauppinen y cols. (1986) que está basado en la siguiente reacción catalizada por la luciferasa:

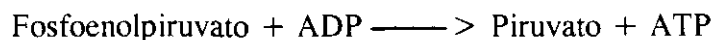


Al añadir una alícuota de la suspensión de sinaptosomas a una mezcla de luciferasa-luciferina se desarrolla una luminiscencia cuya intensidad es proporcional a la concentración de ATP. La luminiscencia se midió con un luminómetro LKB modelo 1250.

1 mg de sinaptosomas se resuspendieron en medio Elliots con BSA (0,67mg proteína/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg proteína/ml) en medio Elliots sin BSA. A una alícuota de 100µls de la suspensión se añadieron 100µls de una mezcla de HClO₄ 1M y EDTA 50mM para precipitar proteínas. Las muestras se mantuvieron un minuto en hielo y a continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto. Se recogió el sobrenadante y se neutralizó con una mezcla de KOH 3M y TEA 1,5M durante 2 minutos a 4°C. Seguidamente, se centrifugó a 12.000 xg durante un minuto, recogiendo el sobrenadante para el ensayo de ATP.

El ensayo de ATP se realizó en tubos de luminómetro 2174-086 de LKB, en los que se preincubaron 57µls de luciferasa a 25°C durante 5 minutos con 143µls de un tampón formado por TRIS 100mM, EDTA 2mM, MgCl₂ 5mM, dithiotreitol 6mM y KCl 2mM, pH=7,5. Los tubos se introdujeron en el luminómetro obteniéndose la luminiscencia basal. A continuación se adicionó 10µls de la muestra y se observó un incremento en la luminiscencia proporcional a la cantidad de ATP en la muestra.

Con esta técnica, también se determinó la concentración de ADP acoplando la reacción siguiente:



Para la determinación del contenido de ADP, en los mismos tubos donde se realizó el ensayo de ATP se añadió fosfoenolpiruvato 2mM y 2 unidades de piruvato kinasa, manteniéndose 10 minutos en oscuridad para el desarrollo de la reacción. El incremento de la luminiscencia observado sobre la lectura anterior a la que se determinó el ATP, corresponde a la cantidad de ADP existente en la muestra. Finalmente, en cada tubo se añadió un patrón interno de 20 pmoles de ATP con el fin de realizar los cálculos de contenido de ATP y ADP que se expresaron como pmoles de nucleótido/mg de proteína.

2.11. Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas se realizó según el método Biuret (Gornall y cols. 1947), utilizando como proteína patrón albúmina de suero bovino a una concentración de 10 mg/ml. La determinación se realizó según el siguiente esquema:

	tubo 1 (blanco)	tubo 2 (patrón)	tubo 3 (sinap.)
Tritón 10% (μ l)	200	200	200
Agua (μ l)	600	600	600
Biuret (μ l)	1200	1200	1200
BSA (μ l)	—	80	—
Sinap. (μ l)	—	—	80

Los tubos se agitaron e inmediatamente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. La concentración de proteínas de la muestra problema se expresó en mg/ml.

RESULTADOS

1. Parámetros de la liberación de glutamato en terminaciones sinápticas de corteza cerebral.

Como ya se ha señalado en la Introducción, la liberación del glutamato almacenado en las vesículas sinápticas comienza con la elevación en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} que tiene lugar tras la despolarización de la membrana plasmática y la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Por el contrario, la liberación de glutamato citoplásmico está mediada por la reversión del transportador de glutamato dependiente de Na^+ y K^+ de la membrana plasmática. Esta liberación de glutamato citoplásmico se pone de manifiesto en las despolarizaciones prolongadas de la membrana plasmática, pero es un proceso independiente de Ca^{2+} . Los sinaptosomas, al carecer de su unión con el axón, no pueden recibir la señal despolarizante, y por tanto la liberación del neurotransmisor, hay que inducirla con diversos métodos bioquímicos, como son una alta concentración de ClK ó veratridina, que producen una despolarización permanente (Nicholls y Shira 1986, Sánchez-Prieto y cols. 1987 a) o con el bloqueante de canales de K^+ , 4-aminopiridina que causa despolarizaciones transitorias (Tibbs y cols. 1989 a). La tabla 1, muestra los parámetros de la liberación de glutamato en sinaptosomas de corteza cerebral obtenidos con estos tres agentes despolarizantes. La liberación dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-aminopiridina 1mM y ClK 30mM fue de 3.10 ± 0.18 y 3.27 ± 0.25 nmoles/mg de proteína, respectivamente y representa aproximadamente un 15% del total de glutamato que se libera tras la rotura de los sinaptosomas con tritón X-100; mientras que la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por el activador de canales de Na^+ fue ligeramente inferior con valores de 2.40 ± 0.27 nmoles/mg de proteína.

El carácter electrogénico del transportador de glutamato de la membrana plasmática conlleva, en condiciones despolarizantes, la reversión de dicho transporte y la liberación de glutamato citoplásmico. Esta vía de salida del aminoácido es independiente de Ca^{2+} , es decir, se observa en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular o en presencia de una concentración de Ca^{2+} extracelular de 200nM, como la utilizada en condiciones experimentales. La liberación de glutamato independiente de Ca^{2+} con veratridina fue mayor que con ClK y ésta a su vez mayor que con 4-aminopiridina. Estos resultados podrían explicarse porque en el caso de veratridina hay reducción permanente tanto del componente eléctrico como químico del gradiente electroquímico de Na^+ . El mayor efecto de ClK en comparación con 4-

aminopiridina se explicaría por la despolarización permanente de ClK frente a la despolarización transitoria del bloqueante de canales de K^+ , 4-aminopiridina.

<u>Liberación de Glutamato (nmol/mg)</u>			
	<u>Dependiente de Ca^{2+}</u>	<u>Independiente de Ca^{2+}</u>	<u>Total</u>
4-AP 1mM	3.10 ± 0.18	0.69 ± 0.27	21.56 ± 1.01
KCl 30mM	3.27 ± 0.25	1.50 ± 0.32	22.01 ± 1.05
Ver. 300 μ M	2.40 ± 0.27	2.00 ± 0.25	ND

Tabla 1. Parámetros de la liberación de Glutamato en sinaptosomas de corteza cerebral de rata. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se preincubaron a 37° durante una hora en medio Elliotts con BSA (1mg/ml). A continuación 1ml de esta suspensión se transfirió a una cubeta de fluorímetro que contenía NADP 1mM y 50 U de glutamato deshidrogenasa y la liberación de glutamato se analizó como se describe en Material y Métodos. La secreción se inició por despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM, ClK 30mM ó veratridina 100 μ M y se determinó durante cinco minutos. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se calculó como la diferencia entre la secreción obtenida en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y la observada en el medio de incubación en que se mantuvo la $[Ca^{2+}]$ libre a 200nM. y que se denominó liberación independiente de Ca^{2+} . El contenido total de glutamato se determinó en presencia del detergente tritón X-100 al 0,4 %. Los resultados son la media \pm SEM de al menos, cinco experimentos independientes. ND, no determinado.

2. La activación de la proteína quinasa C aumenta la liberación de glutamato.

Numerosos estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos han demostrado por un lado la presencia de proteína quinasa C en las terminaciones sinápticas (Girard y cols. 1985) y por otro, se ha observado que la activación de esta quinasa por los ésteres de forbol potencia la liberación dependiente de Ca^{2+} de una gran variedad de neurotransmisores (Nichols y cols. 1987, Lynch y Bliss 1986, Tanaka y cols. 1986). La figura 2 demuestra que la activación de la proteína quinasa C presináptica también aumenta la liberación de glutamato. Así, la adición del éster de forbol 4 β -PDBu 1 μ M, incrementa sustancialmente la liberación de glutamato inducida por una concentración submáxima de 50 μ M de 4-aminopiridina, en un medio con Cl_2Ca 1,33mM (figura 2A). Este efecto potenciador de los ésteres de forbol es estereoespecífico ya que no se observa con el éster de forbol inactivo 4 α -PDD (figura 2C). Por el contrario, cuando

los sinaptosomas se someten a una despolarización permanente con ClK 10mM, se observa sólo un ligero incremento en la liberación de glutamato (figura 2B).

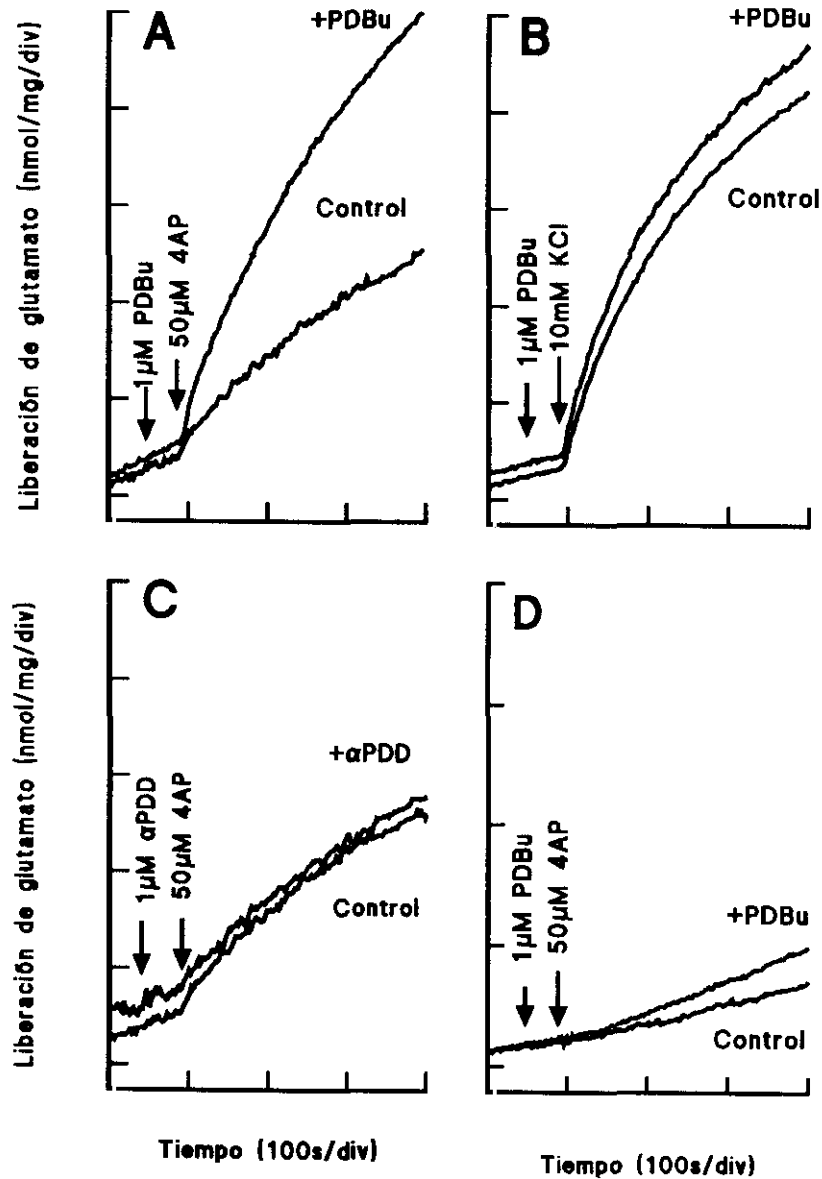


Figura 2. Los ésteres de forbol potencian la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-aminopiridina sin afectar la liberación inducida por KCl. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se preincubaron a 37°C durante una hora en medio Elliots con BSA (1mg/ml). A continuación, 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33mM (A,B y C) y en medio de incubación en que se mantuvo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ libre a 200nM (D). Los ésteres de forbol, 4β-PDBu y 4α-PDD se añadieron 30 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina (50µM) o con KCl (10mM). Los resultados son la media de tres preparaciones de sinaptosomas.

El efecto potenciador de la activación de la proteína quinasa C es mayoritariamente sobre la liberación dependiente de Ca^{2+} , ya que cuando el experimento mostrado en la figura 2A, se repite pero en presencia de una concentración extracelular de Ca^{2+} libre de 200nM, se observa sólo un efecto marginal de los ésteres de forbol sobre la liberación citoplásmica de glutamato (figura 2D).

La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} es disparada por un aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tras la despolarización de la membrana plasmática y apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El objetivo de los siguientes experimentos fue distinguir si el incremento en la liberación de glutamato inducido por los ésteres de forbol era debido a un aumento de la sensibilidad de la exocitosis al Ca^{2+} , o si por el contrario, era causado por una alteración de la elevación de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} intrasinaptosomal inducida por la despolarización de la membrana plasmática por 4-aminopiridina. La figura 3A muestra que la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por 4-aminopiridina 50 μM es de 42.10 ± 2.5 nM y que la adición de 4 β -PDBu incrementa la elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por 4-aminopiridina en un 200% como se observa en la figura 3B. Estos resultados indican que la activación de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol aumenta considerablemente la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina por un incremento en la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Ahora bien, este aumento en la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ puede ser debido a un efecto directo de la proteína quinasa C en los canales de Ca^{2+} o bien, a una mayor duración de los potenciales de acción iniciados por 4-aminopiridina, lo que también se traduciría en una mayor entrada de Ca^{2+} , ya que los canales de Ca^{2+} acoplados a la liberación de glutamato no experimentan inactivación por despolarización (McMahon y Nicholls 1990). Para distinguir entre estas dos posibilidades, se estimó el potencial de membrana con el indicador fluorescente DisC₂(5). La figura 3C muestra la despolarización inducida por 4-aminopiridina 50 μM en sinaptosomas control, observándose en la figura 3D que el éster de forbol, 4 β -PDBu aumenta de forma sustancial la despolarización de los sinaptosomas inducida por 4-aminopiridina. Estos resultados sugieren que el incremento en la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} observado, tras la activación de la proteína quinasa C con los ésteres de forbol, es consecuencia de un incremento en la despolarización inducida por 4-aminopiridina y que podría estar mediada por un alargamiento o un incremento en la frecuencia de los potenciales de acción inducidos por 4-aminopiridina, lo que a su vez conduciría a

una mayor entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y a un incremento en la liberación de glutamato.

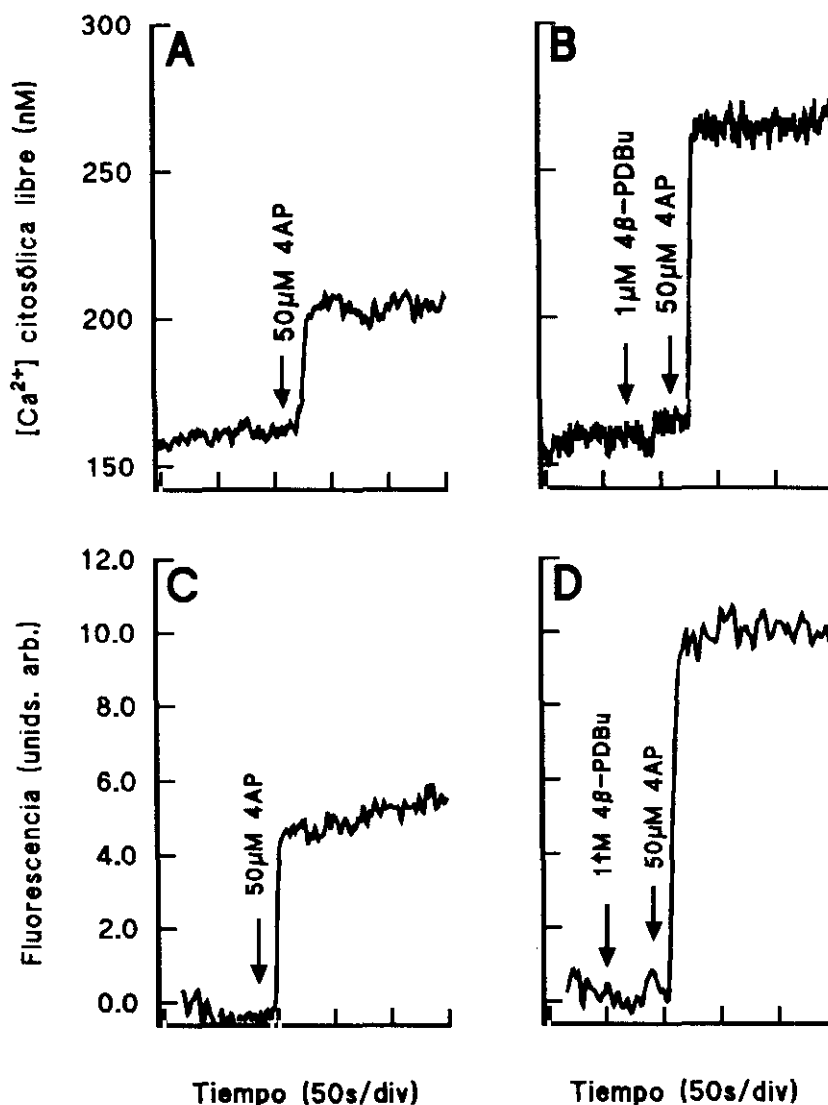


Figura 3. 4β-PDBu incrementa la elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} libre y la despolarización inducidos por 4-aminopiridina. En los experimentos en los que se determinó la concentración intrasínaptosomal de Ca^{2+} libre (A y B), los sinaptosomas purificados por Ficoll (2mg/ml) se resuspendieron en un medio de incubación Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron con Fura 2-AM 5μM y Cl_2Ca 1,33mM durante 30 minutos. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en un medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se añadió Cl_2Ca 1,33mM. La concentración intrasínaptosomal de Ca^{2+} libre se estimó según se describe en Material y Métodos. En los experimentos en los que se estimó el potencial de membrana (C y D), los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se incubaron en medio Elliotts en presencia de BSA (1mg/ml) durante una hora a 37°. Una alícuota de 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar el potencial de membrana en presencia de $\text{DisC}_2(5)$ 5μM y Cl_2Ca 1,33mM. El éster de forbol, 4β-PDBu (1μM) se añadió 30 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina, 1mM. Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos independientes.

3. Influencia de la albúmina de suero bovino, BSA, en las acciones de los ácidos grasos endógenos y exógenos sobre la liberación de glutamato.

En los últimos años se ha demostrado que los ácidos grasos poli-insaturados, principalmente el ácido araquidónico y varios metabolitos formados a partir de la vía lipooxigenasa, constituyen una nueva clase de segundos mensajeros que podrían modular la liberación de diversos neurotransmisores (Piomelli y Greengard, 1990). Ahora bien, los efectos de los ácidos grasos en la liberación de neurotransmisores no están bien establecidas. Por un lado, se ha observado que el ácido araquidónico incrementa la liberación de glutamato inducida por altas concentraciones de ClK (Lynch y Voss 1990, Freeman y cols. 1991), mientras que en otras publicaciones se señala que el ácido araquidónico y los metabolitos de éste, inhiben la liberación tanto de glutamato (Freeman y cols. 1990) como de otros neurotransmisores (Piomelli y cols. 1987 a, Ehrenguber y Zahler 1991). Por tanto, nos planteamos estudiar el papel de los ácidos grasos en la liberación de glutamato en los sinaptosomas de corteza cerebral.

En nuestro grupo de investigación los ensayos de liberación de glutamato se han realizado de una manera sistemática en un medio de incubación en el que está presente la albúmina de suero bovino (BSA), a una concentración de 1mg/ml. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a los ácidos grasos que se forman por hidrólisis de los lípidos de la membrana durante la incubación de los sinaptosomas, reduciéndose de esta manera su contenido en forma libre (Rhoads y cols 1983). Por tanto, el primer planteamiento que nos hicimos fue estudiar los efectos de la presencia de BSA en la liberación de glutamato para lo cual, los sinaptosomas se incubaron en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de BSA como se muestra en la figura 4.

La liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina 1mM en presencia de Cl_2Ca 1,33mM disminuye a medida que se reduce la concentración de BSA en el medio de incubación con valores de 4.05 ± 0.12 , 3.08 ± 0.10 y 2.25 ± 0.08 nmoles/mg de proteína según la concentración de BSA es de 1, 0.1 ó 0 mg/ml, respectivamente, figuras 4A, B y C. La adición de ácido araquidónico exógeno a concentraciones superiores a la capacidad de unión de ácidos grasos libres de la albúmina de suero bovino también reduce la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina 1mM, aunque la magnitud de esta reducción depende de la presencia o

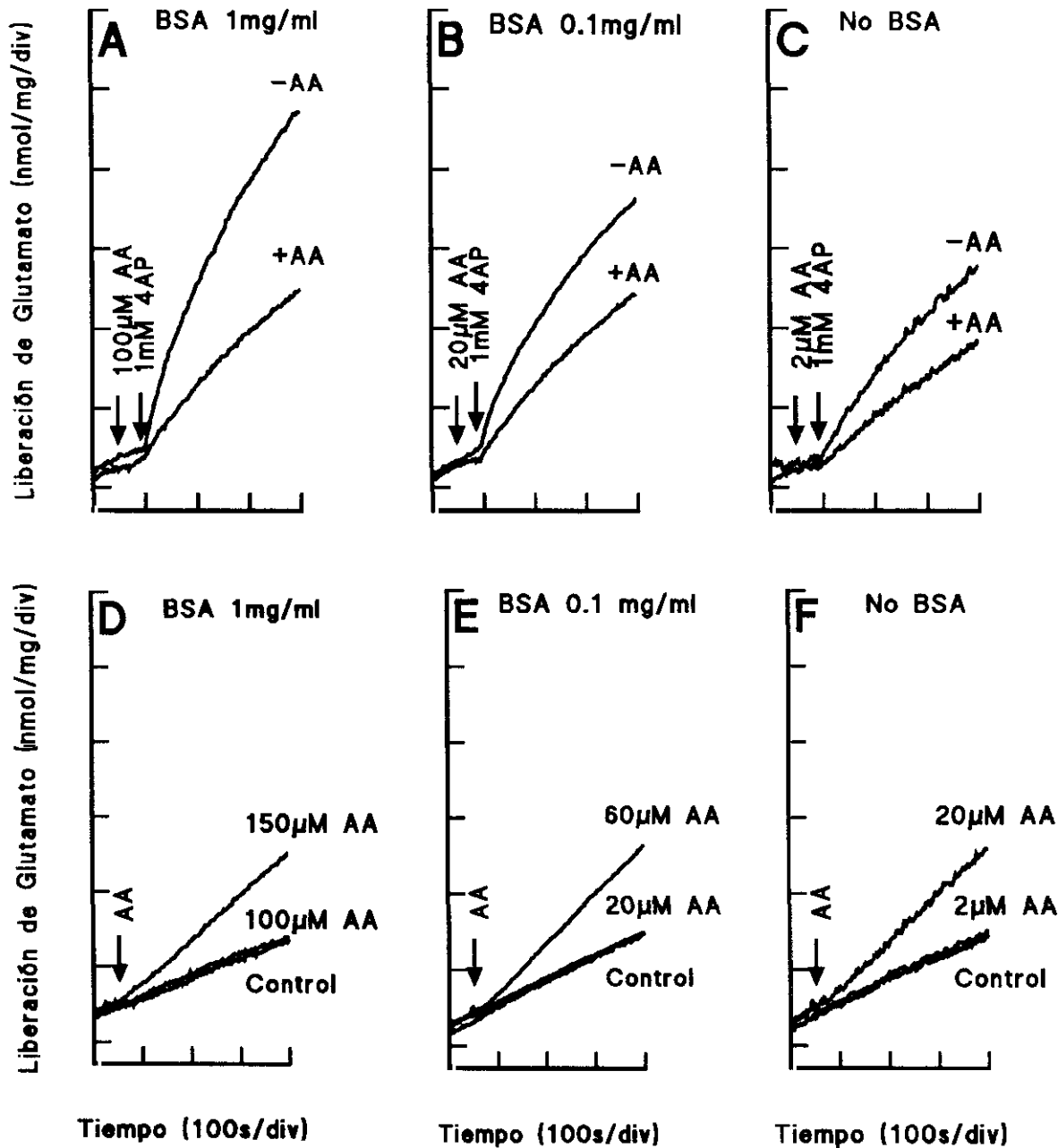


Figura 4. Los ácidos grasos endógenos y el ácido araquidónico exógeno inhiben la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con las concentraciones de BSA indicadas y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación, 1ml de esta suspensión se utilizaron para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33mM (A,B y C) y en medio de incubación en el que se mantuvo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ libre en 200nM (D, E y F). En A, B y C, el ácido araquidónico (AA) se añadió 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina (1mM). D, E y F muestran los efectos del ácido araquidónico, en la liberación basal de glutamato en sinaptosomas polarizados. Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos independientes.

no de BSA en el medio de incubación, es decir, de que exista o no una inhibición previa por los ácidos grasos endógenos (figuras 4A, B y C). Las acciones inhibitoras tanto de los ácidos grasos endógenos como del ácido araquidónico exógeno tienen lugar sobre el componente dependiente de Ca^{2+} porque en un medio con una concentración de Ca^{2+} libre de 200nM, ni los ácidos grasos endógenos ni las concentraciones de ácido araquidónico que reducen la liberación total de glutamato, afectan la liberación basal de glutamato que se observa en sinaptosomas polarizados, figuras 4D, E y F. Ahora bien, concentraciones superiores de ácido araquidónico provocan la salida de glutamato citoplásmico, debido a un efecto detergente sobre los sinaptosomas como se discutirá más adelante. Estos resultados indican, al mismo tiempo, que para las distintas concentraciones de BSA existe un estrecho margen de concentraciones de ácido araquidónico para producir, bien una inhibición de la liberación de glutamato, bien un efecto detergente.

A diferencia de la sensibilidad a la albúmina de suero bovino, BSA de la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina que acabamos de describir, la liberación de glutamato inducida por ClK no se vió afectada cuando se eliminó el BSA del medio de incubación, figuras 5A y B. Estos resultados sugieren que la acción inhibitoria de los ácidos grasos está relacionada con el mecanismo de despolarización utilizado.

Puesto que el efecto inhibitor de los ácidos grasos en la liberación de glutamato es sobre el componente dependiente de Ca^{2+} , el siguiente objetivo fue estudiar si los ácidos grasos endógenos podían alterar la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por 4-aminopiridina. Las figuras 6A y C muestran que las elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducidas por 4-aminopiridina 1mM y KCl 30mM con BSA 1mg/ml fueron de 110.20 ± 5.2 y 95.4 ± 6.34 nM, respectivamente. Sin embargo, la incubación de los sinaptosomas en un medio sin BSA, produce una reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por 4-aminopiridina de un 65% sin afectar a la elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por ClK. Por tanto, la inhibición por los ácidos grasos endógenos de la liberación de glutamato está mediada por una reducción en la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por la despolarización con 4-aminopiridina.

En conjunto, estos resultados sugieren, por un lado que la presencia de la albúmina de suero bovino, BSA, en el medio de incubación es necesaria para estudiar el efecto modulador de los ácidos grasos en la liberación de glutamato con el fin de

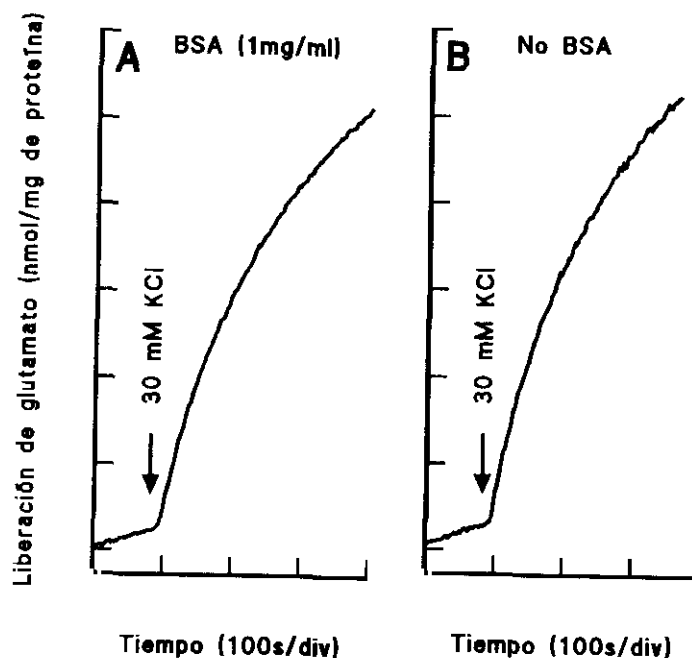


Figura 5. Los ácidos grasos endógenos no afectan a la liberación de glutamato inducida por KCl 30mM. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se preincubaron a 37°C durante una hora en medio Elliotts en presencia de 1mg/ml de BSA (A) o en ausencia de BSA (B). A continuación 1ml de estas suspensiones se utilizaron para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33 mM tras la despolarización de los sinaptosomas con KCl 30 mM. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

prevenir la acción de los ácidos grasos endógenos liberados durante la incubación de los sinaptosomas, y en segundo lugar, que los ácidos grasos inhiben selectivamente la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-aminopiridina sin afectar la estimulada por ClK.

Los experimentos de la figura 4 sugieren que los ácidos grasos endógenos liberados durante la incubación de los sinaptosomas inhiben la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina. Los ácidos grasos mayoritarios de los lípidos de las membranas sinápticas son los ácidos palmítico, esteárico, oleico y araquidónico (Rhoads y cols. 1983). Así pues, con el objeto de averiguar qué ácidos grasos endógenos son los responsables de la acción inhibitoria, estudiamos el efecto de diferentes ácidos grasos que fueron añadidos a concentraciones conocidas. Ahora bien, con el fin de impedir las acciones de los ácidos grasos endógenos, que podrían enmascarar la acción de los ácidos grasos exógenos, diseñamos un protocolo de

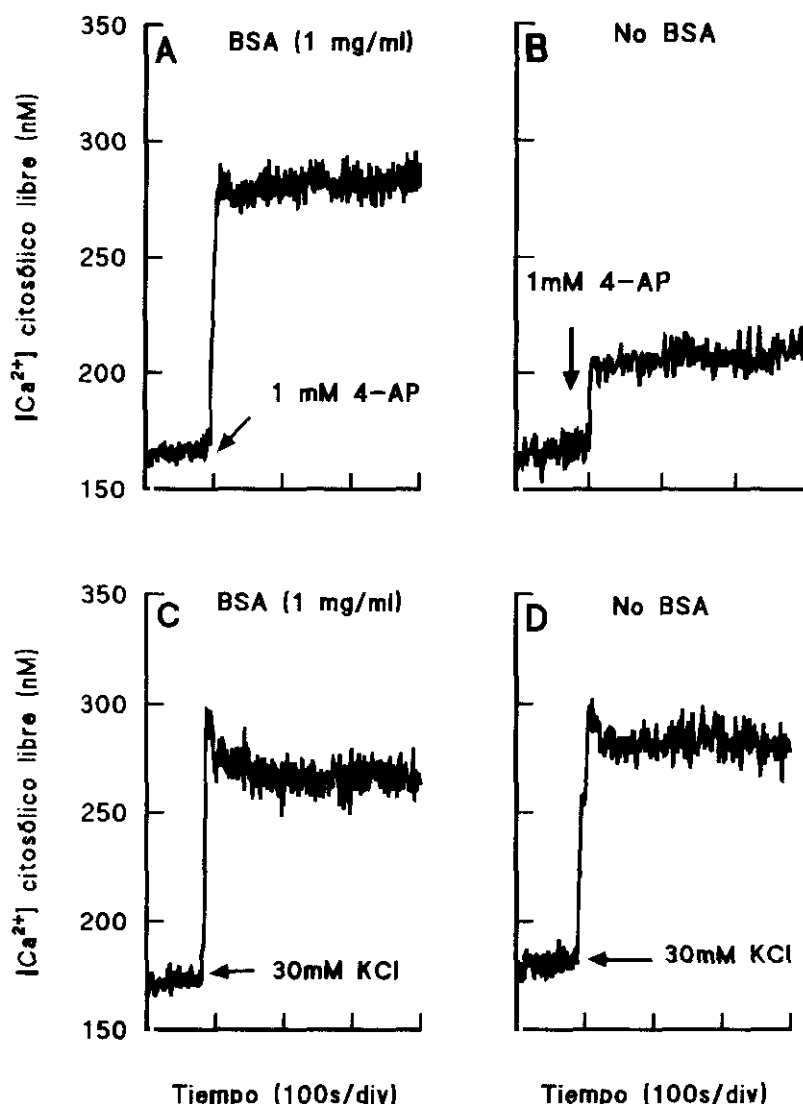


Figura 6. Efecto de los ácidos grasos endógenos en el incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} libre inducida por 4-aminopiridina 1mM y por KCl 30mM. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (2mg/ml) se resuspendieron en medio de incubación Elliotts en presencia de BSA (1mg/ml) (A y C) y en ausencia de BSA (B y D) y se preincubaron con Fura 2-AM 5 μ M y Cl_2Ca 1,33mM durante 30 minutos. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio de incubación Elliotts con las concentraciones de BSA antes indicadas. 1ml de las suspensiones se utilizaron para determinar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ libre en presencia de Cl_2Ca 1,33mM. Los sinaptosomas se despolarizaron con 4-aminopiridina 1mM ó con KCl 30mM. La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se determinó según se describe en Material y Métodos. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

incubación de los sinaptosomas en presencia de BSA 1mg/ml, seguido del lavado por centrifugación y resuspensión en medio Elliotts sin BSA. Este protocolo se ha seguido en todos los experimentos en que se ha estudiado los efectos de los ácidos grasos exógenos sobre los distintos parámetros sinaptosomales.

En la tabla 2, se muestra que todos los ácidos grasos en mayor o en menor medida, inhiben la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-aminopiridina, sin modificar de manera significativa la liberación de glutamato independiente de Ca^{2+} . El ácido graso que presentó mayor efecto inhibitor fue el ácido araquidónico seguido de los ácidos oleico y palmítico con una inhibición aproximada del 60%, 50% y 40%, respectivamente.

<u>Liberación de Glutamato (nmol/mg)</u>		
	<u>Dependiente de Ca^{2+}</u>	<u>Independiente de Ca^{2+}</u>
Control	2.86 ± 0.22	1.09 ± 0.10
A. Araquidónico	1.23 ± 0.10	1.07 ± 0.12
A. Araquídico	2.40 ± 0.31	1.12 ± 0.13
A. Caprílico	2.41 ± 0.26	1.09 ± 0.07
A. Elaídico	2.21 ± 0.23	1.10 ± 0.12
A. Esteárico	2.08 ± 0.30	1.11 ± 0.09
A. Linoleico	2.10 ± 0.23	1.10 ± 0.11
A. Mirístico	2.06 ± 0.26	1.13 ± 0.08
A. Oleico	1.57 ± 0.24	1.10 ± 0.11
A. Palmítico	1.87 ± 0.22	1.12 ± 0.08

Tabla 2. Efecto de diferentes ácidos grasos en la liberación de glutamato dependiente e independiente de Ca^{2+} inducidas por 4-aminopiridina. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se preincubaron en medio Elliots con BSA (1mg/ml) a 37°C durante 1 hora. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliots sin BSA. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación dependiente de Ca^{2+} se estimó como la diferencia entre la secreción obtenida en los 5 minutos siguientes a la despolarización en presencia de Cl_2Ca 1,33 mM y la observada en un medio de incubación en que se mantuvo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ libre a 200 nM, denominándose esta última, liberación independiente de Ca^{2+} . Los ácidos grasos (5 μM) se añadieron 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas por 4-aminopiridina, 1mM. Los resultados son la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

4. Caracterización de la inhibición de la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} , por ácido araquidónico.

4.1. Curva concentración-respuesta.

Los experimentos que se describen a continuación se realizaron con ácido araquidónico por su mayor efecto inhibidor sobre la liberación de glutamato.

La figura 7 muestra el efecto inhibidor de distintas concentraciones de ácido araquidónico ($0.1\text{-}10\mu\text{M}$) en la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-aminopiridina. La máxima acción inhibidora, entre el 50-60% se observó con concentraciones entre $1\text{-}10\mu\text{M}$ de ácido araquidónico. Por ello, los experimentos en los que se analizó el mecanismo de la acción inhibidora se utilizaron concentraciones de este rango. Es importante señalar que siguiendo este protocolo de incubaciones en presencia de BSA, lavado e incubación posterior en ausencia de BSA, concentraciones superiores $30\text{-}50\mu\text{M}$ tienen un efecto detergente, afectando a la liberación citoplásmica de glutamato como se verá en el apartado siguiente.

4.2. Efecto detergente de concentraciones altas de ácido araquidónico en los sinaptosomas.

Los experimentos realizados en presencia de una concentración libre de Ca^{2+} de 200nM , han demostrado que concentraciones elevadas de ácido araquidónico incrementan la liberación de glutamato citoplásmico, tanto en sinaptosomas polarizados como en sinaptosomas despolarizados con 4-aminopiridina ó ClK (datos no mostrados). Puesto que estos efectos podrían ser debidos a un posible efecto de las altas concentraciones de ácido araquidónico sobre la integridad de la preparación sinaptosomal, quisimos comprobar esta posibilidad determinando una serie de parámetros como la liberación basal de glutamato, la aparición de actividad del enzima láctico deshidrogenasa (LDH) en el medio de incubación o la pérdida del indicador de Ca^{2+} fura 2-AM acumulado en los sinaptosomas.

En las figuras 8A y B, se pone de manifiesto que el ácido araquidónico a la concentración $10\mu\text{M}$ (b) no modifica la liberación basal de glutamato citoplásmico, ni provoca la aparición de actividad LDH sinaptosomal en el medio de incubación en comparación con los sinaptosomas control (a) que han sido tratados de la misma

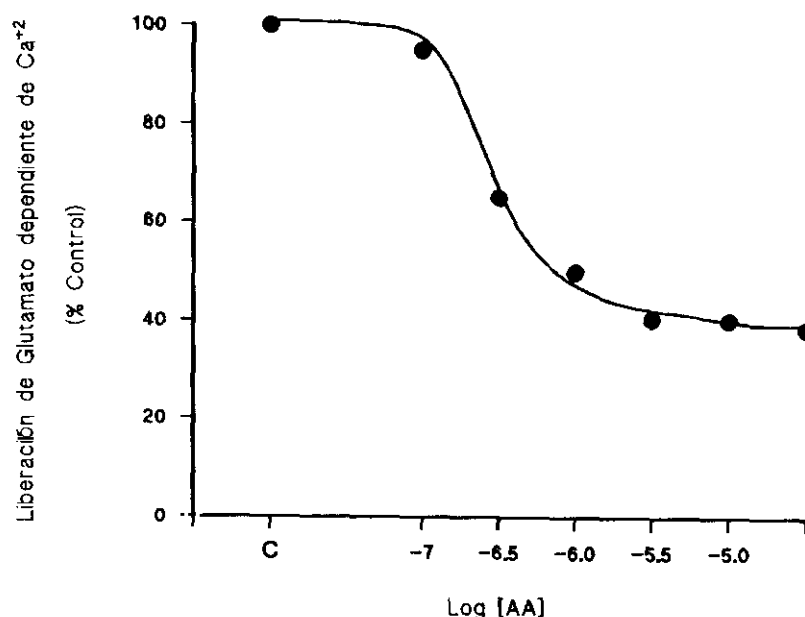


Figura 7. Curva dosis-respuesta de la inhibición de la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-aminopiridina por ácido araquidónico. Los sinaptosomas purificados por ficoll (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se determinó como la diferencia entre la secreción obtenida durante 5 minutos de despolarización en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y la observada en medio de incubación en el que se mantuvo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ libre a 200nM. Las diferentes concentraciones de ácido araquidónico (AA) se añadieron 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM. La liberación de glutamato control (100%) se corresponde $3.15 \pm \text{nmoles glutamato/mg de proteína}$. Los resultados son la media de tres experimentos diferentes.

manera pero en ausencia de ácido araquidónico. Sin embargo, la adición a los sinaptosomas de ácido araquidónico 50 μM (c) conlleva un aumento en la salida de glutamato citosólico, que está asociado a la aparición de hasta un 30% de la actividad total de la LDH sinaptosomal en el medio de incubación.

El efecto de altas concentraciones de ácido araquidónico sobre la integridad de la preparación sinaptosomal se pone también de manifiesto en los ensayos con el indicador fluorescente de Ca^{2+} , fura 2-AM. La figura 8C (a) muestra un ensayo típico con fura-2 donde se puede observar que la adición de Ca^{2+} 1,33mM a los sinaptosomas produce un ligero aumento en la señal fluorescente consecuencia, seguramente, de la acumulación de Ca^{2+} en los sinaptosomas. A continuación, la señal se estabiliza y la adición de 4-aminopiridina 1mM seguida de ClK 30mM

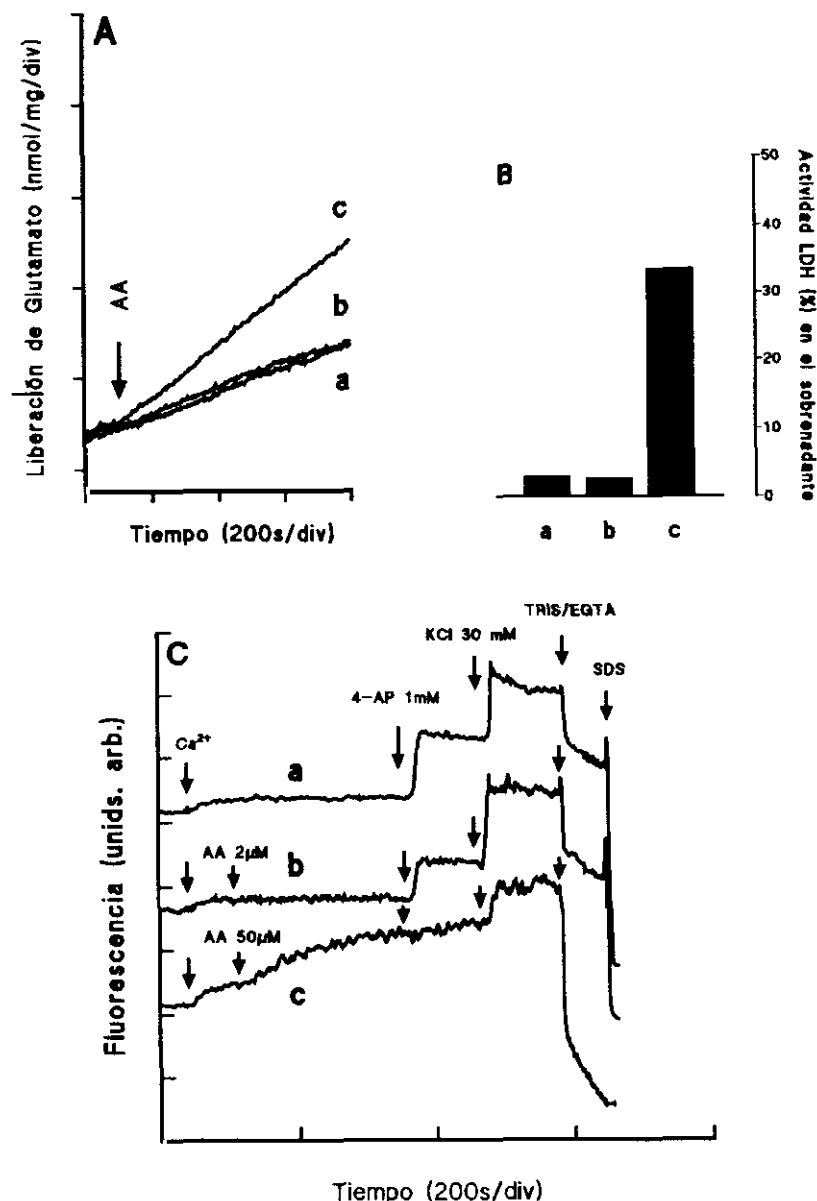


Figura 8. Efecto de una elevada concentración de ácido araquidónico sobre la liberación citoplásmica de glutamato, la liberación de láctico deshidrogenasa y la concentración citosólica de $[Ca^{2+}]$. En los experimentos en los que se determinó la liberación basal de glutamato (A), los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se preincubaron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) a 37°C durante una hora. A continuación se centrifugaron a 12.000 $\times g$ y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA y la liberación de glutamato se determinó en medio con Cl_2Ca 1,33mM, en ausencia (a) y en presencia de ácido araquidónico 2 μ M (b) y 50 μ M (c). En la determinación de la actividad de láctico deshidrogenasa (B), los sinaptosomas purificados por Ficoll se trataron como se indicó anteriormente y una alícuota de 50 μ l se utilizó para determinar la actividad enzimática en ausencia (a) y en presencia de ácido araquidónico, 2 μ M (b) y 50 μ M (c). La actividad de LDH se expresó como % de la actividad total determinada en presencia del detergente tritón X-100 al 0,5%. Para la determinación de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ libre (C) los sinaptosomas purificados por Ficoll (2mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron con Fura 2-AM 5 μ M y Cl_2Ca 1,33mM durante 30 minutos. A continuación se centrifugaron a 12.000 $\times g$ durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA y se añadió Cl_2Ca 1,33mM, calculándose la $[Ca^{2+}]_{cit}$ libre como se describe en Material y Métodos. Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos diferentes.

produce sendos incrementos en la señal como consecuencia de la despolarización inducida por estos agentes. La adición subsiguiente de Tris-EGTA produce una caída instantánea de la señal fluorescente que es debida a la quelación del Ca^{2+} extrasinaptosomal y que nosotros tenemos como índice de fura extrasinaptosomal, seguida de una caída más lenta debida posiblemente a la salida de Ca^{2+} de los sinaptosomas. En los experimentos con ácido araquidónico $2\mu\text{M}$ que se muestran en la figura 8C (b) no se observa ningún efecto en la señal fluorescente salvo una reducción en el incremento inducido por la despolarización de los sinaptosomas por 4-aminopiridina. Sin embargo, concentraciones más elevadas de este ácido graso $50\mu\text{M}$, figura 8C (c) provocan un aumento progresivo en la señal fluorescente con pérdida total o parcial de la respuesta a las adiciones de 4-aminopiridina y ClK, respectivamente. Además, la adición de Tris/EGTA produce ahora una caída de la señal fluorescente tres veces mayor a la encontrada en los experimentos a y b indicativa de una mayor presencia de fura-2 extrasinaptosomal como consecuencia de la pérdida de integridad de los sinaptosomas.

A la vista de estos resultados se puede concluir que deben emplearse concentraciones de ácido araquidónico no superiores a $10\mu\text{M}$ para evitar alteraciones de la integridad de la preparación sinaptosomal y que puede dificultar la interpretación correcta de los resultados.

4.3. Mecanismo de la inhibición por el ácido araquidónico de la liberación de glutamato.

La figura 9 muestra, que al igual que en el caso de los ácidos grasos endógenos, el ácido araquidónico exógeno ($5\mu\text{M}$) inhibe la liberación de glutamato cuando los sinaptosomas se despolarizan con 4-aminopiridina (figura 9A), sin afectar la liberación iniciada por la despolarización con ClK 30mM (figura 9B). En este caso además, el ácido araquidónico tampoco altera la liberación inducida por la activación permanente de los canales de Na^+ , con veratridina (figura 9C). Hay que señalar, que en presencia de veratridina se produce una disminución rápida de la concentración intrasinaptosomal de ATP, por estimulación de la bomba de Na^+ como consecuencia del aumento en la concentración de Na^+ citoplásmico (McMahon y Nicholls, 1990). Puesto que esta disminución de la concentración de ATP podría inhibir la exocitosis de glutamato que tiene una fuerte dependencia de energía (Sánchez-Prieto y cols.

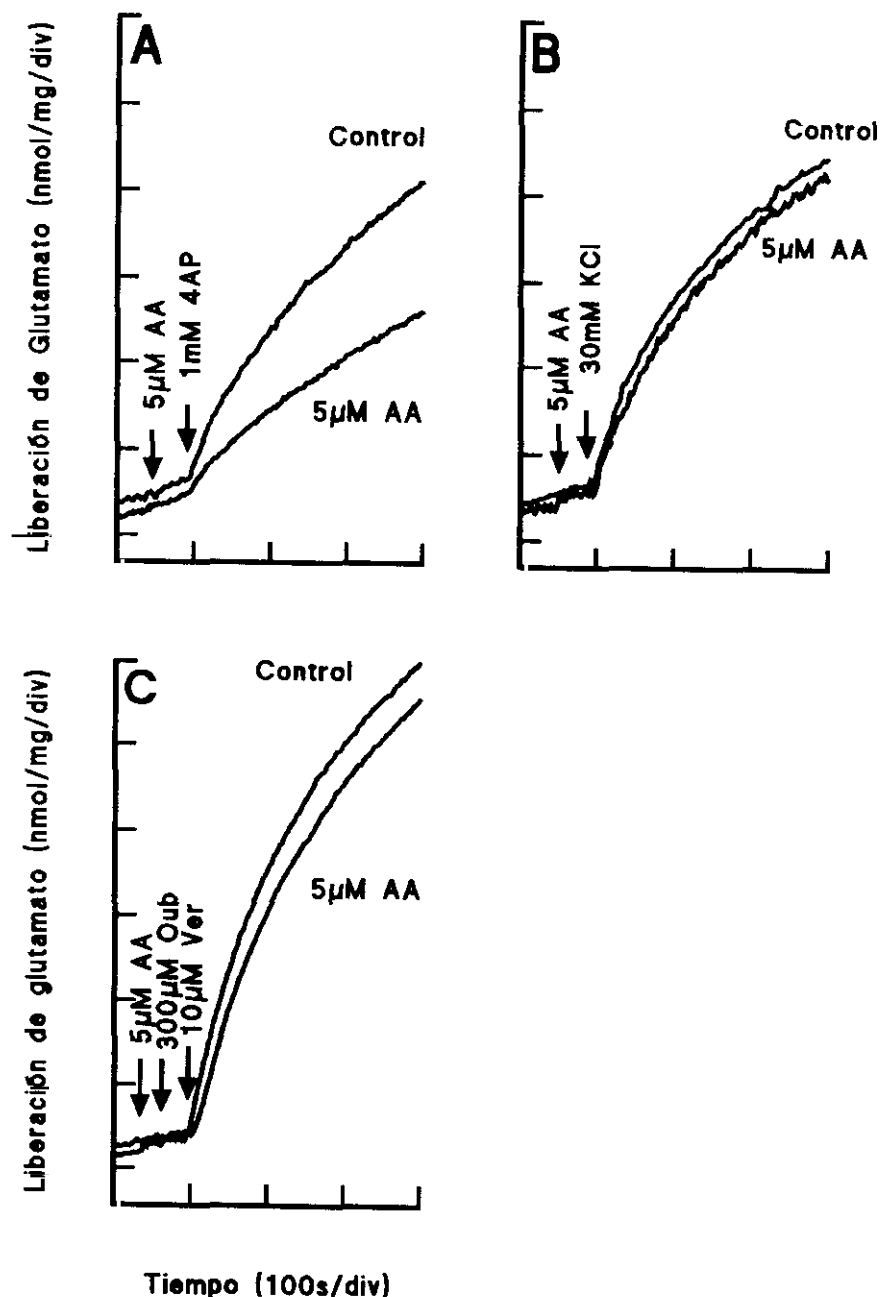


Figura 9. El ácido araquidónico inhibe la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina sin afectar a la secreción de glutamato inducida por KCl y por veratridina. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron a 37° durante una hora. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33mM. El ácido araquidónico AA (5μM) se añadió 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM (A), KCl 30 mM (B) ó con veratridina 100 μM en este último caso, en presencia de 300 μM ouabaina (C). Los resultados que se muestran son la media de tres preparaciones de sinaptosomas.

1987 a), en los experimentos de veratridina, se añadió el inhibidor de la bomba de Na^+ , ouabaina, para prevenir una posible deplección energética.

La liberación de glutamato vesicular por exocitosis requiere el mantenimiento de un cociente ATP/ADP intrasinaptosomal alto. Así, se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores metabólicos que reducen la concentración intrasinaptosomal de ATP, reducen parcial o totalmente, si la caída energética es severa, la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} (Sánchez-Prieto y cols. 1987 a, Sánchez-Prieto y González 1988). Así mismo, hay que señalar que los ácidos grasos insaturados desacoplan la fosforilación oxidativa mitocondrial, reduciendo los niveles de ATP. Una reducción de los niveles de ATP, no parece ser la causa de la inhibición por el ácido araquidónico de la liberación de glutamato, ya que este efecto inhibitorio solo se observa con 4-aminopiridina pero no con ClK ó veratridina. No obstante, para descartar esta posibilidad, se determinaron los niveles intrasinaptosomales de ATP y ADP en presencia de este ácido graso. En la tabla 3 se muestra que efectivamente el ácido araquidónico a la concentración de $10\mu\text{M}$ no altera los niveles de ATP intrasinaptosomales, ahora bien, concentraciones más elevadas, $30\mu\text{M}$, produce una caída rápida de los niveles de ATP, con el consiguiente incremento en las concentraciones de ADP. Estos datos proporcionan, por tanto, una razón más para evitar concentraciones de ácido araquidónico superiores a $10\mu\text{M}$ en los experimentos con sinaptosomas.

Con el fin de profundizar en el mecanismo de la acción inhibitoria del ácido araquidónico en la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} , se procedió a determinar los cambios en la concentración intrasinaptosomal de Ca^{2+} libre. La figura 10A muestra que la inhibición por el ácido araquidónico de la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina se puede explicar por la reducción en la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. En cambio, la falta de efecto del ácido araquidónico en la liberación de glutamato inducida por ClK se corresponde también con la ausencia de efecto alguno en la concentración intrasinaptosomal de Ca^{2+} como se muestra en la figura 10B.

La 4-aminopiridina y ClK liberan glutamato del mismo compartimento intrasinaptosomal, pero sus mecanismos de acción son diferentes. ClK induce una despolarización permanente de la membrana plasmática, que activa los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, pero que es resistente al bloqueante de los canales de Na^+ ,

		<u>nmol/ mg de proteína</u>	
		<u>ATP</u>	<u>ADP</u>
Control	60 s	1.42 ± 0.09	0.28 ± 0.06
	120 s	1.40 ± 0.10	0.31 ± 0.04
	360 s	1.43 ± 0.05	0.32 ± 0.02
AA 10 μ M	60 s	1.40 ± 0.05	0.32 ± 0.10
	120 s	1.43 ± 0.04	0.33 ± 0.08
	360 s	1.46 ± 0.03	0.36 ± 0.03
AA 30 μ M	60 s	1.38 ± 0.06	0.47 ± 0.05
	120 s	1.06 ± 0.08	0.73 ± 0.07
	360 s	0.82 ± 0.09	0.96 ± 0.09

Tabla 3. Efecto del ácido araquidónico sobre el contenido de ATP y ADP de los sinaptosomas. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliots con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliots sin BSA, al que se añadió Cl₂Ca 1,33mM y ácido araquidónico (AA) a las concentraciones indicadas, recogiendo alícuotas (100 μ ls) para la determinación del contenido de ATP y ADP a distintos tiempos tras la adición del ácido araquidónico. Los resultados son la media \pm SEM (nmol/mg de proteína) de dos experimentos diferentes.

tetrodotoxina. Por el contrario, la 4-aminopiridina produce despolarizaciones transitorias, que activan los canales de Ca²⁺, con participación también de canales de Na⁺, como lo demuestra su sensibilidad a tetrodotoxina, y de canales transitorios de K⁺. Una posible explicación de la acción selectiva de ácido araquidónico sobre la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina, sería que el control de la liberación de glutamato ejercido por el ácido araquidónico está basado en la modulación de canales transitorios, observables solo bajo un régimen de despolarizaciones repetitivas como el inducido por 4-aminopiridina, y no con la despolarización permanente de ClK. Así, el ácido araquidónico podría modificar los canales iónicos que controlan la duración o la frecuencia de los potenciales de acción individuales. Para investigar esta posibilidad, se estimaron los potenciales de membrana con el indicador fluorescente DisC₂(5). En la figura 10C se muestra que el ácido araquidónico reduce la despolarización inducida por 4-aminopiridina en toda la población de terminales sinápticos, lo que en una terminación sináptica única se podría traducir en una reducción en la duración o en la frecuencia de los potenciales

de acción iniciados por 4-aminopiridina. Por el contrario, el ácido araquidónico no modificó la despolarización inducida por ClK (figura 10D).

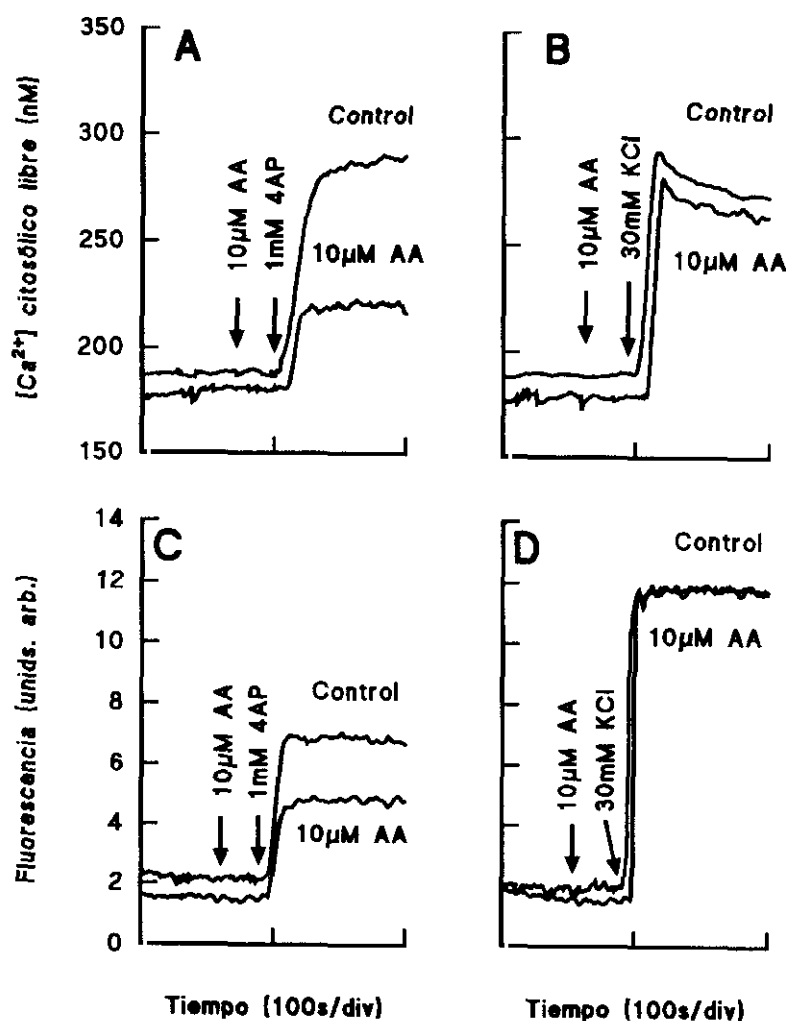


Figura 10. El ácido araquidónico reduce la elevación de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} libre y la despolarización de la membrana inducidos por 4-aminopiridina, pero no por KCl. En los experimentos en los que se determina la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (A y B), los sinaptosomas purificados por Ficoll se resuspendieron (2mg/ml) en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron con Fura 2-AM 5 μ M y Cl_2Ca 1,33mM durante 30 minutos. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en un medio Elliotts sin BSA y se añadió Cl_2Ca 1,33mM. La concentración intrasinaptosomal de Ca^{2+} libre se determinó según se describe en Material y Métodos. En los experimentos en los que se determinó el potencial de membrana (C y D), los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se preincubaron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) a 37° durante 1 hora. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y el indicador fluorescente DisC₂(5) 5 μ M. El potencial de membrana se estimó según se describe en Material y Métodos. El ácido araquidónico (AA) se añadió 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina (A y C) ó con KCl 30mM (B y D). Los resultados son la media de al menos tres preparaciones de sinaptosomas diferentes.

El tetraetilamonio, TEA, es un bloqueante, aunque no específico, de los canales de K^+ que están implicados en la repolarización y por tanto, en la terminación de los potenciales de acción (Bartschat y Blaustein 1985). Esta inhibición de canales de K^+ por la alquilamina conlleva un aumento en la duración de los potenciales de acción con el consiguiente incremento en la entrada de Ca^{2+} y en la liberación de neurotransmisores. Puesto que los efectos de tetraetilamonio parecen ser opuestos a los del ácido araquidónico, decidimos estudiar la posible reversión por tetraetilamonio de las acciones inhibitoras del ácido araquidónico, para lo cual, analizamos en primer lugar los efectos de tetraetilamonio en los sinaptosomas en ausencia de ácido araquidónico. La adición de tetraetilamonio 10mM no tiene efecto alguno sobre la liberación de glutamato, ni sobre la concentración citoplásmica de Ca^{2+} , ni tampoco modifica la respuesta inducida en estos parámetros por una concentración elevada de 4-aminopiridina, 1mM (figuras 11A y C). Sin embargo, el tetraetilamonio aumenta sustancialmente la liberación de glutamato y la elevación en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} inducida por una concentración submáxima de 4-aminopiridina 50 μ M, figuras 11B y D.

La figura 12 muestra que el tetraetilamonio es capaz de revertir las acciones inhibitoras del ácido araquidónico en la despolarización, en la elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} y en la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina (figuras 12B, D y F en comparación con A, C y E). Estos resultados sugieren que el ácido araquidónico y el tetraetilamonio podrían tener efectos opuestos sobre los canales de K^+ implicados en el control de la duración de los potenciales de acción inducidos por 4-aminopiridina.

4.4. La acción inhibitora del ácido araquidónico en la liberación de glutamato es independiente de la activación de la proteína quinasa C.

Recientemente se ha demostrado que algunos isoenzimas de la proteína quinasa C son activados por los ácidos grasos poli-insaturados como el ácido araquidónico (Shearman y cols. 1991). Por otro lado, existen también numerosos datos que demuestran que la proteína quinasa C modula las funciones neuronales a través de cambios en la permeabilidad iónica de las membranas (Murakami y Routtenberg 1989). Los experimentos que se detallan a continuación fueron diseñados para determinar si la inhibición de la exocitosis de glutamato por el ácido araquidónico estaba mediada por la activación de la proteína quinasa C. En estos experimentos se

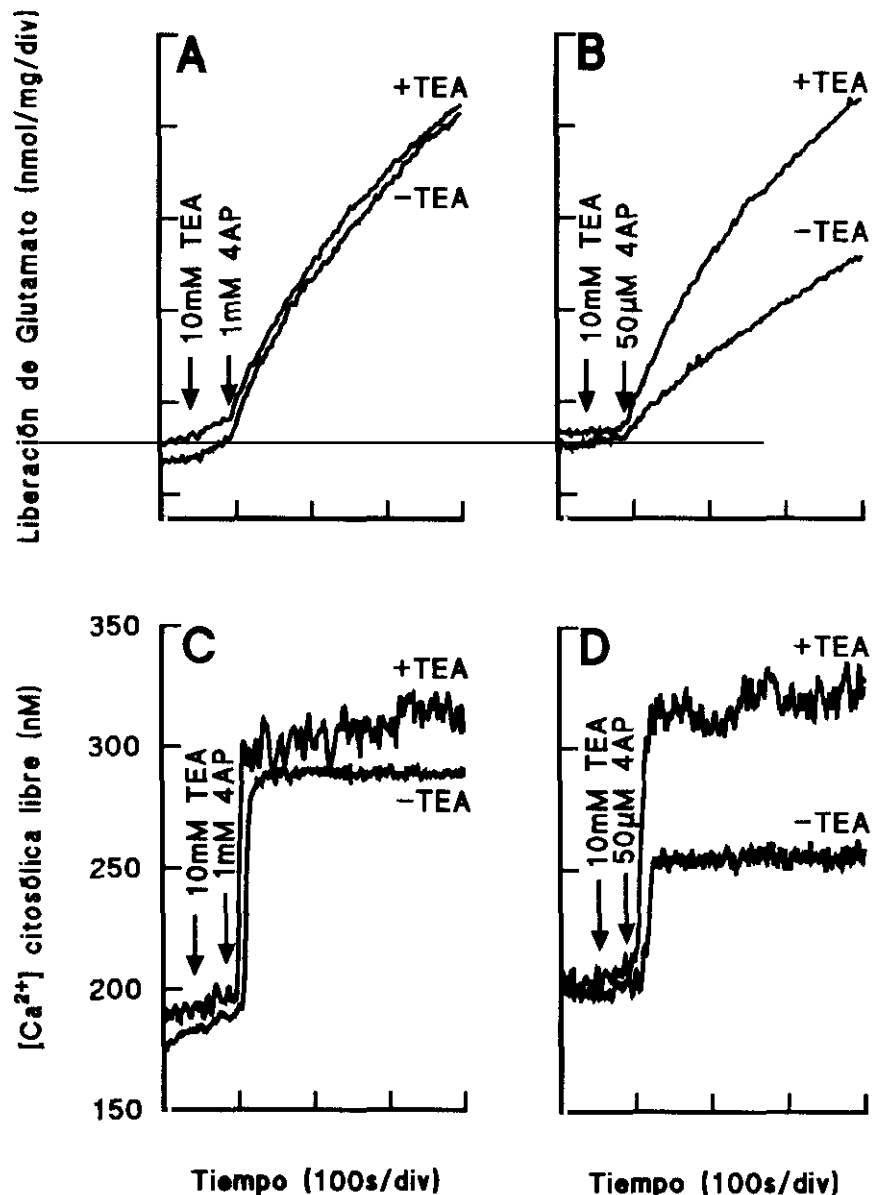


Figura 11. Efecto de tetraetilamonio (TEA) sobre la liberación de glutamato y sobre el incremento en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} libre inducidos por 4-aminopiridina. En los experimentos de liberación de glutamato (A y B) los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33mM. En los experimentos en los que se determinó la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (C y D) los sinaptosomas purificados por Ficoll (2mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron con Fura 2-AM 5µM y Cl_2Ca 1,33mM durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA añadiéndose Cl_2Ca 1,33mM. El tetraetilamonio (TEA) (10mM) se adicionó 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina, 1mM (A y C) o 50µM (B y D). Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

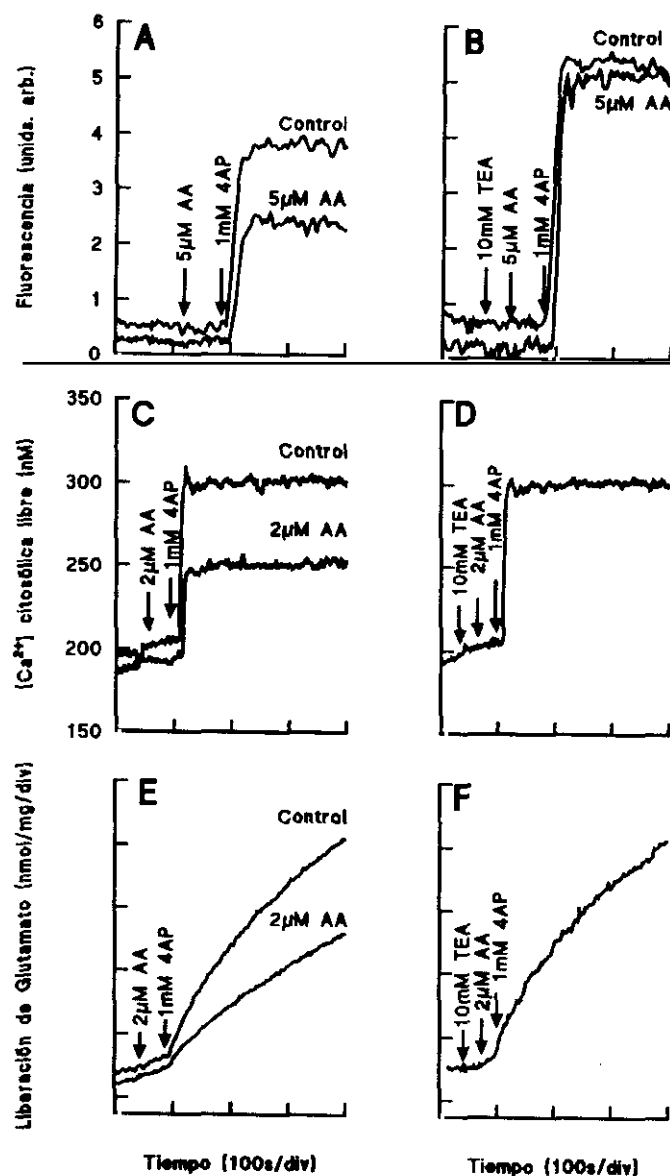


Figura 12. Tetraetilamonio revierte los efectos inhibitorios del ácido araquidónico sobre la despolarización, el incremento en la concentración citoplásmica de Ca^{2+} libre y la liberación de glutamato inducidos por 4-aminopiridina. En los experimentos en los que se determinó el potencial de membrana (A y B), los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y el indicador fluorescente $DisC_2(5)$ 5 μ M. En los experimentos en los que se determinó la $[Ca^{2+}]_{cit}$ libre (C y D), los sinaptosomas purificados por Ficoll (2mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron con Fura 2-AM 5 μ M y Cl_2Ca 1,33mM durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA y se añadió Cl_2Ca 1,33mM. En los experimentos de liberación de glutamato (E y F) los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron a 37°C durante una hora. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33mM. El tetraetilamonio (TEA) (10mM) y el ácido araquidónico (AA) (5 μ M) se añadieron 60 s y 30 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

utilizó como control positivo de un efecto mediado por la proteína quinasa C, la potenciación de la liberación de glutamato por el éster de forbol 4 β -PDBu.

En una primera serie de experimentos, los sinaptosomas se preincubaron con altas concentraciones de ésteres de forbol. Este tratamiento produce una rápida disminución de la actividad fosforilante de la proteína quinasa C sobre histona H₁, debido a la traslocación de la proteína quinasa del citosol a las membranas seguido de la degradación proteolítica por proteasas del tipo de las calpaínas. La figura 13 muestra los efectos sobre la actividad de la proteína quinasa C sinaptosomal tras el pretratamiento con altas concentraciones de ésteres de forbol. La actividad de la proteína quinasa C se determinó por su capacidad de fosforilación del sustrato exógeno Histona H₁ en presencia de Ca²⁺ y de los fosfolípidos, fosfatidilserina y oleil-acetilglicerol. También se determinó la actividad quinasa independiente de Ca²⁺ y fosfolípidos, como índice de formación de proteína quinasa M, por degradación proteolítica de la proteína quinasa C.

La figura 13 muestra que en las alícuotas tomadas 1 y 30 minutos después del tratamiento de los sinaptosomas por el éster de forbol 4 β -PDBu, se obtuvo una reducción de la actividad de proteína quinasa C dependiente de Ca²⁺ y fosfolípidos de un 50 y un 85%, respectivamente. Al mismo tiempo se detectó un incremento transitorio de la actividad independiente de Ca²⁺ y fosfolípidos, que se redujo notablemente en las muestras tomadas a los 30 minutos. Estos cambios en la actividad de la proteína quinasa C no se observaron ni en los sinaptosomas control ni en los tratados con el forbol inactivo, 4 α -PDD.

En la figuras 14A y B se muestra que la preincubación de los sinaptosomas con PMA 1 μ M no modifica la liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ inducida por 4-aminopiridina, pero tampoco previene el efecto inhibitor del ácido araquidónico. Sin embargo, la eliminación de parte de la actividad de la proteína quinasa C, por preincubación con ésteres de forbol, eliminó el efecto potenciador de 4 β -PDBu sobre la liberación de glutamato (figuras 14C y D).

Puesto que el tratamiento con ésteres de forbol no elimina totalmente la actividad de la proteína quinasa C, podría ser que la actividad residual de este enzima fuera responsable de la acción inhibitora del ácido araquidónico sobre la secreción de glutamato. Por ello, en una segunda serie de experimentos, se utilizó el inhibidor de

proteínas quinasas, estaurosporina (Linden y Routtenberg 1989, Yanihara y cols., 1991), que es capaz de interaccionar con el dominio regulador de dichas quinasas (Wolf y Baggiolini 1988). En la figura 15 se muestra que la estaurosporina a la concentración utilizada carece de efecto sobre la liberación control de glutamato, figura 15B, aunque, es capaz de prevenir la potenciación de la exocitosis de glutamato inducida por 4 β -PDBu, figura 15C y D. Sin embargo, el efecto inhibitor del ácido araquidónico sobre la liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ fué resistente al inhibidor de proteína quinasas, figura 15A y B.

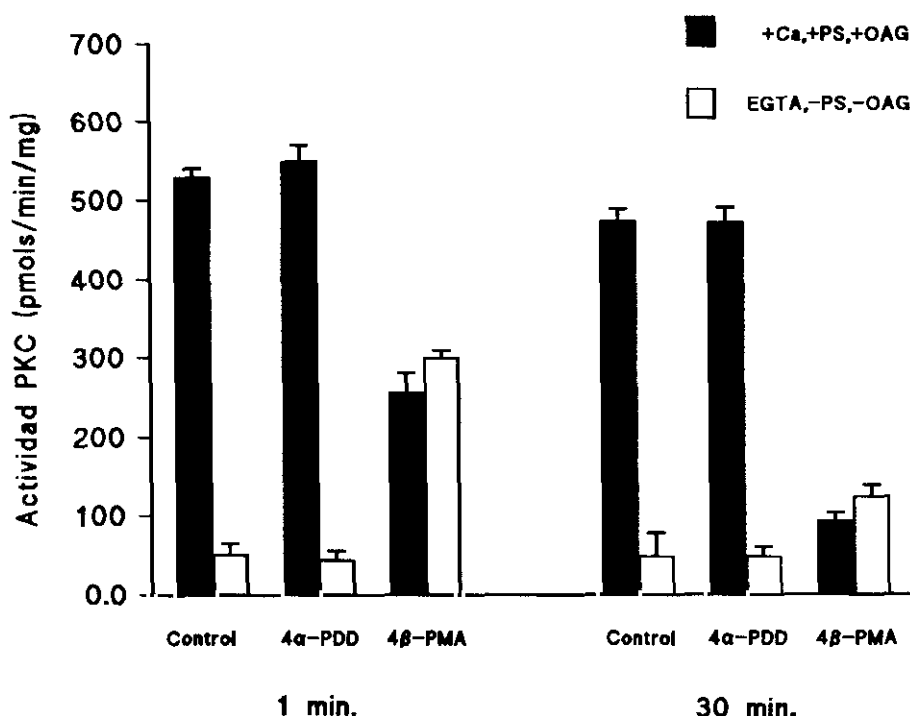


Figura 13. Disminución de la actividad de la proteína quinasa C dependiente de Ca²⁺ y fosfolípidos por preincubación de los sinaptosomas con ésteres de forbol. Los sinaptosomas purificados por Ficoll se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron a 37°C. A los 5 minutos se añadió Cl₂Ca 1,33 mM y un minuto más tarde se añadieron los ésteres de forbol 4 β -PDBu o 4 α -PDD a la concentración 1 μ M. Transcurridos 1 y 30 minutos de la adición de los ésteres de forbol, se extrajeron alícuotas (2mg/ml), que se colocaron en hielo y se centrifugaron a 12.000 xg durante 10 minutos. El control se trató de la misma manera pero en ausencia de ésteres de forbol. A continuación, la actividad de la proteína quinasa C se determinó en los sedimentos resultantes, extrayéndola con el detergente Nonidet 0,5 % como se indica en Material y Métodos. La actividad de la proteína quinasa C se determinó en presencia y ausencia de Ca²⁺ y fosfolípidos. Los resultados que se muestran son las medias \pm SEM de tres preparaciones de sinaptosomas.

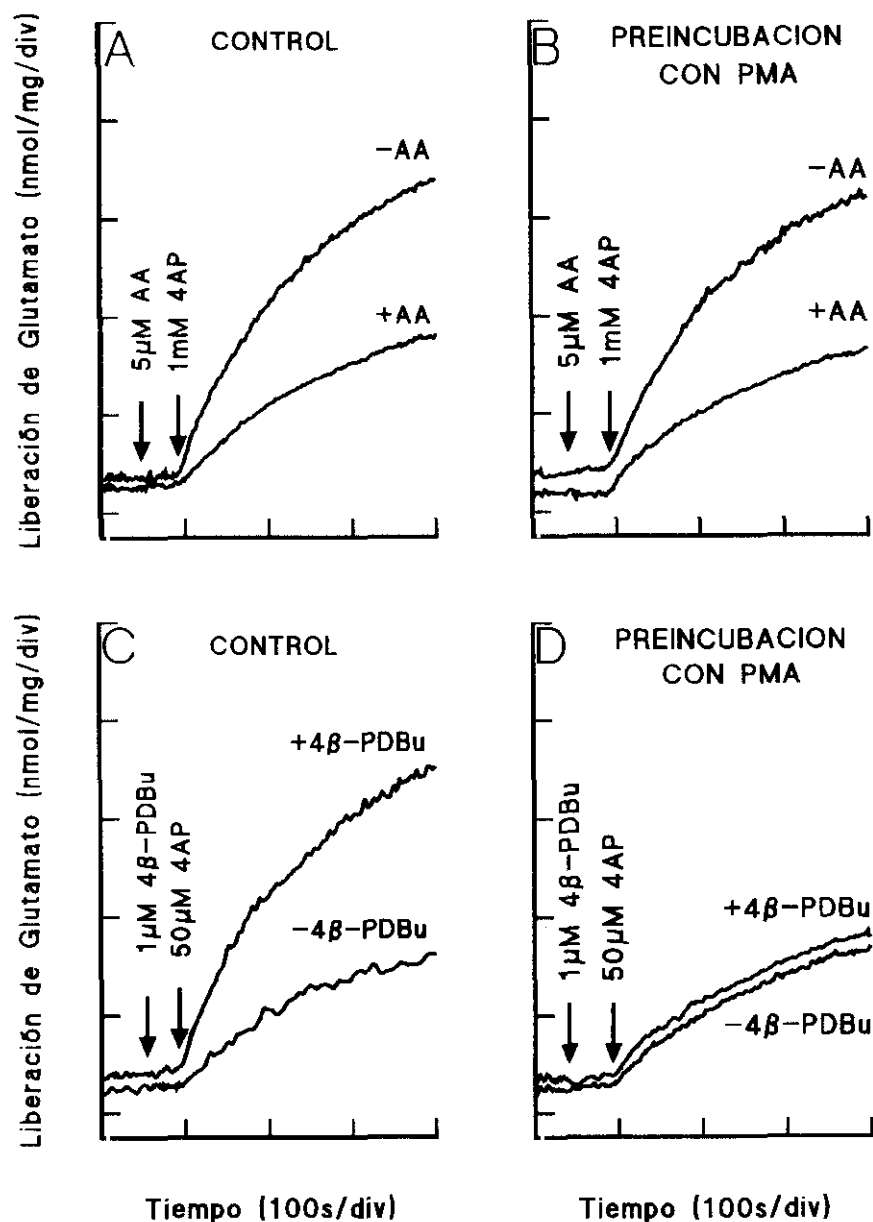


Figura 14. El pretratamiento de los sinaptosomas con ésteres de forbol elimina el efecto potenciador de 4β-PDBu sobre la liberación de glutamato pero no el efecto inhibitor del ácido araquidónico. Los sinaptosomas purificados por Ficoll, control (A y C) se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron a 37°C durante una hora. Otra suspensión de sinaptosomas se trató con PMA 1μM (B y D), y se continuó la incubación durante otros 30 minutos. Seguidamente, tanto los sinaptosomas control como los tratados previamente con PMA, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, utilizándose 1ml de la suspensión para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl₂Ca 1.33 mM. El ácido araquidónico (AA) (5μM) y el éster de forbol, 4β-PDBu (1μM) se adicionaron 60 s y 30 s respectivamente, antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM o 50μM. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

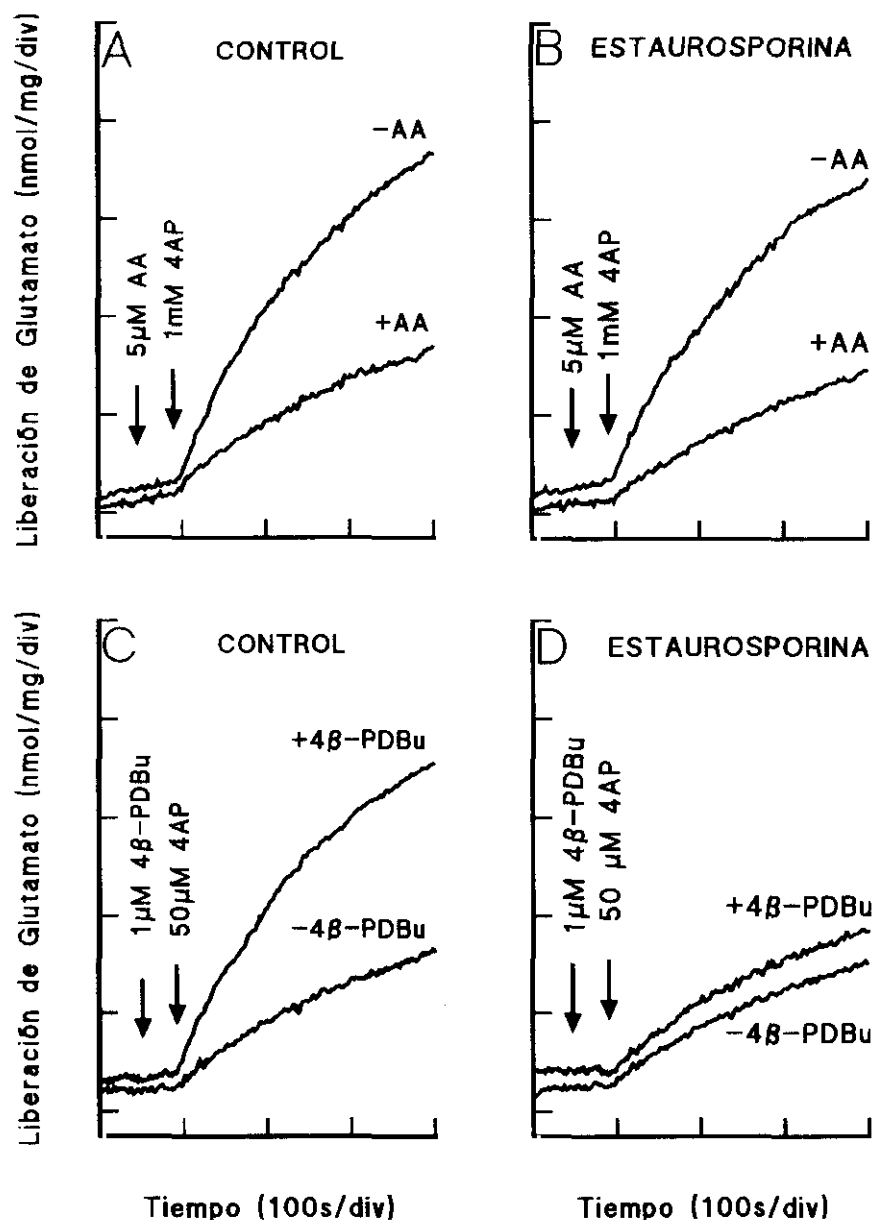


Figura 15. Estaurosporina anula la estimulación inducida por 4 β -PDBu sobre la exocitosis de glutamato pero no el efecto inhibitor del ácido araquidónico. Los sinaptosomas purificados por Ficoll, control (A y C) se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. Otra serie de sinaptosomas, a los 30 minutos de la incubación, se trataron con estaurosporina, St (100nM) (B y D) y se continuó la incubación por otros 30 minutos. A continuación, tanto los sinaptosomas control como los tratados son estaurosporina se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en un medio Elliotts sin BSA, utilizándose 1ml de la suspensión para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl₂Ca 1,33 mM. El ácido araquidónico (AA) (5 μ M) y el éster de forbol, 4 β -PDBu (1 μ M) se añadieron 60 s y 30 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM o 50 μ M. Los resultados son medias de tres experimentos independientes.

Una forma alternativa y probablemente más directa de estudiar la posible implicación de la proteína quinasa C en la acción inhibitoria del ácido araquidónico en la exocitosis de glutamato es emplear el derivado esterificado, metilaraquidonato, que es mucho menos eficaz que el ácido araquidónico como activador de la proteína quinasa C (Murakami y Routtenberg 1985). En la figura 16 se muestra que el metilaraquidonato posee una potencia inhibitoria de la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} similar a la del ácido araquidónico, a pesar de no ser un activador eficaz de la proteína quinasa C.

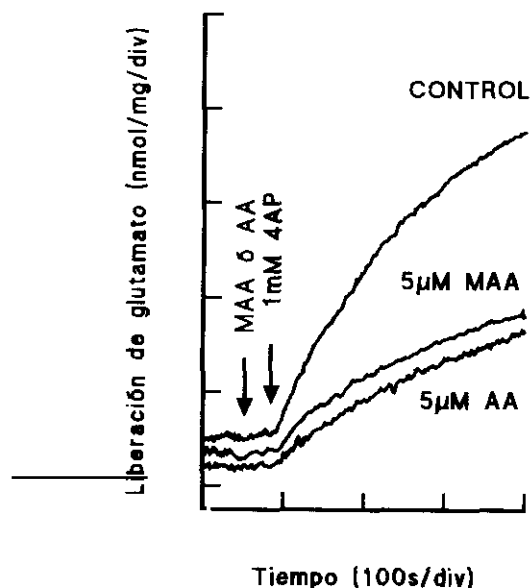


Figura 16. Metilaraquidonato inhibe la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina. Los sinaptosomas purificados por Ficoll se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, utilizándose 1ml de la suspensión para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33 mM. El ácido araquidónico AA, (5µM) y metilaraquidonato, MAA (5µM) se adicionaron 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM. Los resultados son medias de tres experimentos diferentes.

En su conjunto, todos estos resultados sugieren que la acción inhibitoria del ácido araquidónico sobre la exocitosis de glutamato es independiente de la activación de la proteína quinasa C.

4.5. Persistencia de la acción inhibitoria del ácido araquidónico en presencia de inhibidores del metabolismo del ácido graso.

Los ácidos grasos poli-insaturados son rápidamente metabolizados a productos oxigenados por distintos sistemas enzimáticos como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y

monooxigenasa (Shimizu y Wolfe 1990). Se ha sugerido que varios de estos metabolitos como el 12(s)HETE y el 12-HPETE, que se forman por las vías 5 y 12 lipooxigenasa, respectivamente, y no el ácido graso en sí, serían los responsables de los efectos moduladores de la liberación de neurotransmisores (Piomelli y Greengard 1990, Freeman y cols. 1991).

Con el fin de obtener información acerca de si es el ácido araquidónico y/o sus metabolitos los responsables de la acción inhibitoria observada, se realizaron una serie de experimentos para determinar el tiempo de latencia entre la adición del ácido araquidónico y la aparición del efecto inhibitorio, para lo cual alteramos la secuencia de las adiciones utilizadas en el experimento de liberación, despolarizando los sinaptosomas primero y añadiendo a continuación el ácido araquidónico. En la figura 17 se observa una rápida acción inhibitoria del ácido araquidónico, que está probablemente en el límite de resolución de nuestro ensayo fluorimétrico que es de un segundo. Ahora bien, este método no permite descartar que los efectos sean debidos a metabolitos del ácido araquidónico, puesto que la formación de los derivados oxigenados de ácido araquidónico, es también extremadamente rápida.

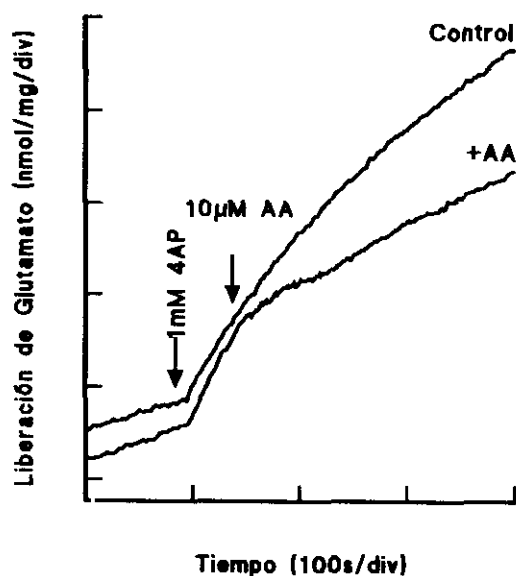


Figura 17. Rápida inhibición por el ácido araquidónico de la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliots con BSA (1mg/ml) y se preincubaron durante una hora a 37°C. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliots sin BSA. 1ml de la suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33 mM. El ácido araquidónico, AA, se adicionó 30 s después de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina, 1mM. Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos diferentes.

En otra serie de experimentos los sinaptosomas fueron incubados con indometacina ($5\mu\text{M}$) y ácido nordihidroguayarático (NDGA) ($10\mu\text{M}$), que son inhibidores de los sistemas enzimáticos de ciclooxigenasa y de lipoxigenasa, respectivamente. De los datos presentados en la figura 18 se deduce, en primer lugar, que la incubación de los sinaptosomas con indometacina y NDGA no modifica la secreción de glutamato inducida por 4-aminopiridina, y en segundo lugar, que en presencia de estos inhibidores persiste la reducción de la exocitosis de glutamato inducida por el ácido araquidónico. Estos resultados podrían indicar que los metabolitos del ácido araquidónico formados por las vías ciclooxigenasa y lipooxigenasa no están implicados en la acción inhibidora del ácido graso.

4.6. Efecto del ácido araquidónico en la concentración extrasinaptosomal de glutamato.

El transportador de glutamato utiliza el gradiente electroquímico de Na^+ para mantener un enorme gradiente de concentración entre el citoplasma y el medio extracelular. Recientemente se ha descrito que el ácido araquidónico y/o sus metabolitos inhiben el transportador de glutamato en los terminales sinápticos y células gliales (Rhoads y cols. 1983, Barbour y cols. 1990, Volterra y cols. 1992), incrementando los niveles extracelulares de glutamato. Por ello, decidimos estudiar si el ácido araquidónico tenía algún efecto sobre la concentración extrasinaptosomal de glutamato como indicador de la actividad del transportador.

La figura 19 muestra que los sinaptosomas polarizados de corteza cerebral de rata mantienen una concentración extrasinaptosomal de glutamato $[\text{glu}]_{\text{ext}}$ de $2.92 \pm 0.49 \mu\text{M}$ y que tras dos minutos de incubación con ácido araquidónico $10\mu\text{M}$, no se observó cambio alguno en la $[\text{glu}]_{\text{ext}}$. La adición de BSA ($16\mu\text{M}$) produjo en cambio una ligera reducción. Estos resultados indican que el ácido araquidónico a las concentraciones empleadas en nuestro ensayo no altera la capacidad de transporte de glutamato y si lo hacen, esta acción no se traduce en un cambio en la concentración extrasinaptosomal de glutamato.

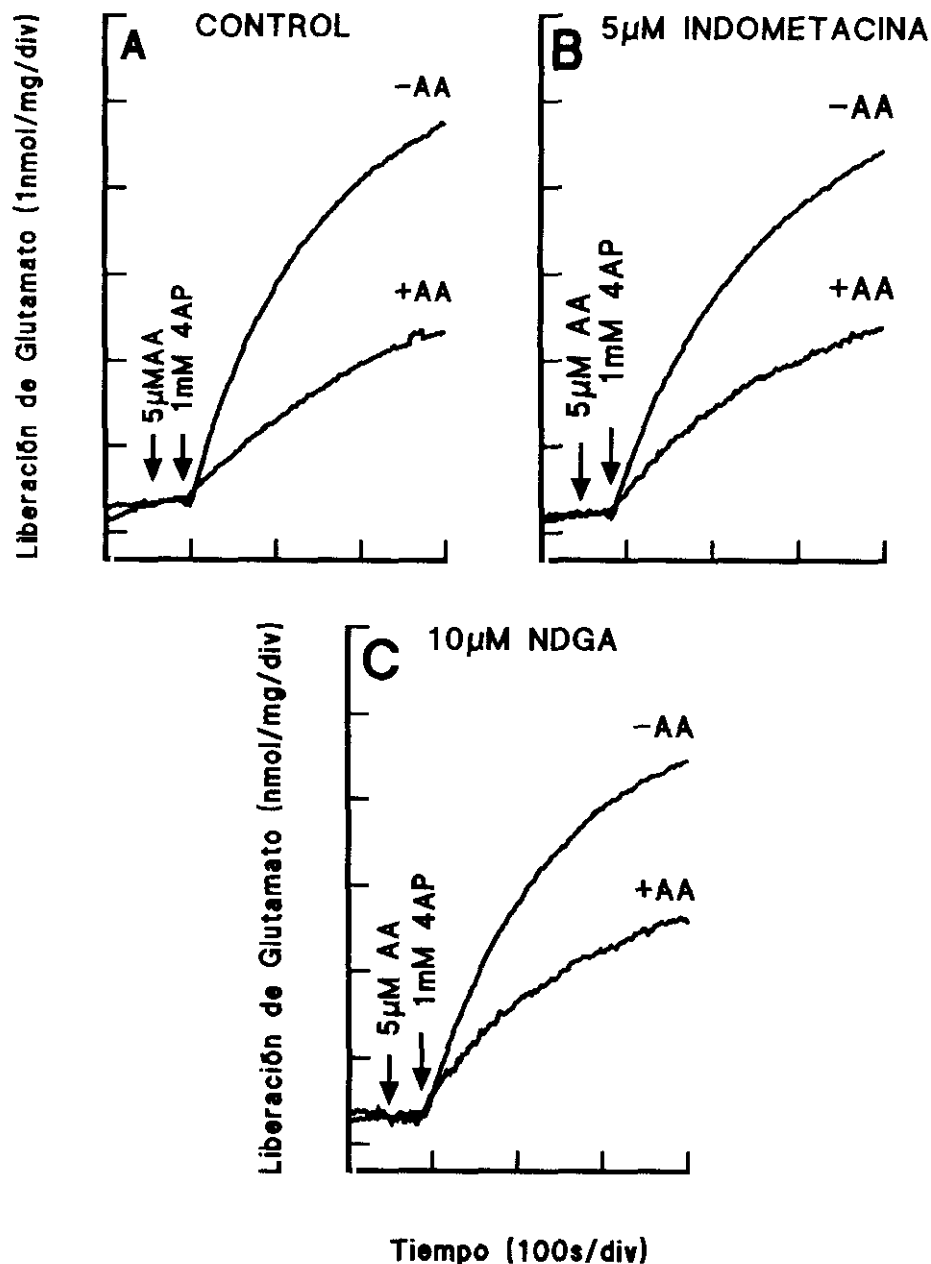


Figura 18. Indometacina y el ácido nordihidroguayarático (NDGA) no previenen el efecto inhibitorio del ácido araquidónico. Los sinaptosomas purificados por Ficoll (0,67 mg/ml) se resuspendieron en medio de incubación Elliotts y se preincubaron durante una hora a 37°C. En otras series de sinaptosomas, transcurridos 30 y 50 minutos de incubación, se adicionó indometacina (5µM)(B) y NDGA (10µM)(C), respectivamente, y la incubación continuó hasta los 60 minutos. A continuación tanto los sinaptosomas control como los tratados con indometacina y NDGA se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, utilizándose 1ml de esta suspensión para determinar la liberación de glutamato en presencia de Cl_2Ca 1,33 mM. El ácido araquidónico AA (5µM) se añadió 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina, 1mM. Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos diferentes.

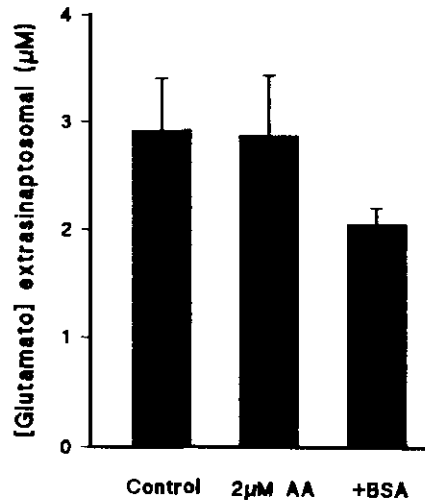


Figura 19. Efecto del ácido araquidónico y de la albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA) en la concentración extrasinaptosomal de glutamato. La fracción P₂ sinaptosomal (0,67mg/ml) se resuspendió en medio Elliotts sin BSA en presencia de Cl₂Ca 1,33 mM. Después de 5 minutos de incubación se recogió alicuotas de 250μls para determinar la [glu]_{ext} como se describe en Material y Métodos. El ácido araquidónico (2μM) se añadió a los 10 minutos de iniciar las incubación, recogiendo una alícuota 2 minutos más tarde. Finalmente, se añadió BSA (1mg/ml) a los 15 minutos, recogiendo de nuevo alícuotas 2 minutos más tarde. Los resultados que se muestran son la media ± SEM de cuatro preparaciones de sinaptosomas.

5. Activación sinérgica de la proteína quinasa C: efectos en la liberación de glutamato.

En los resultados hasta ahora descritos hemos demostrado que la proteína quinasa C de las terminaciones sinápticas forma parte de una vía de transducción de señales que facilita la liberación de glutamato. La publicación de una serie de trabajos sobre la activación de algunas isoformas de proteína quinasa C por el ácido araquidónico (Shearman y cols. 1991 b, Murakami y Routtenberg 1985), junto con el papel de mensajero intercelular propuesto para este ácido graso y sus metabolitos, nos hizo pensar que el ácido araquidónico podría ser la señal extracelular que activaría la vía dependiente de la proteína quinasa C. Sin embargo, los resultados mostrados en las secciones anteriores demuestran que el ácido araquidónico, lejos de producir los mismos efectos que la activación de la proteína C con los ésteres de forbol, inhibe la liberación de glutamato por un mecanismo que parece ser independiente de la activación de la proteína quinasa C. Mientras realizábamos estos estudios se publicaron por el grupo de Nishizuka una serie de trabajos mostrando la acción sinérgica de ciertos ácidos grasos insaturados con el diacilglicerol o los ésteres de forbol en la activación de la proteína quinasa C (Shinomura y cols. 1991). Por ello, el

siguiente objetivo que nos propusimos fué la posible acción sinérgica de los ésteres de forbol y del ácido araquidónico sobre la exocitosis de glutamato.

La figura 20 muestra que la adición de ácido araquidónico ($2\mu\text{M}$) inhibe la exocitosis de glutamato inducida por 4-aminopiridina. Así mismo, se observa que la adición de bajas concentraciones del éster de forbol $4\beta\text{-PDBu}$ ($1\text{-}50\text{nM}$) no tienen efecto alguno sobre la liberación de glutamato y que altas concentraciones de $4\beta\text{-PDBu}$ (500nM) producen una débil estimulación (15%) de la secreción de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-aminopiridina 1mM . Ahora bien, en presencia de ácido araquidónico, la sensibilidad de la liberación de glutamato a la estimulación por los ésteres de forbol aumentó, observándose que bajas concentraciones de $4\beta\text{-PDBu}$ estimulan fuertemente (230%) la exocitosis de glutamato.

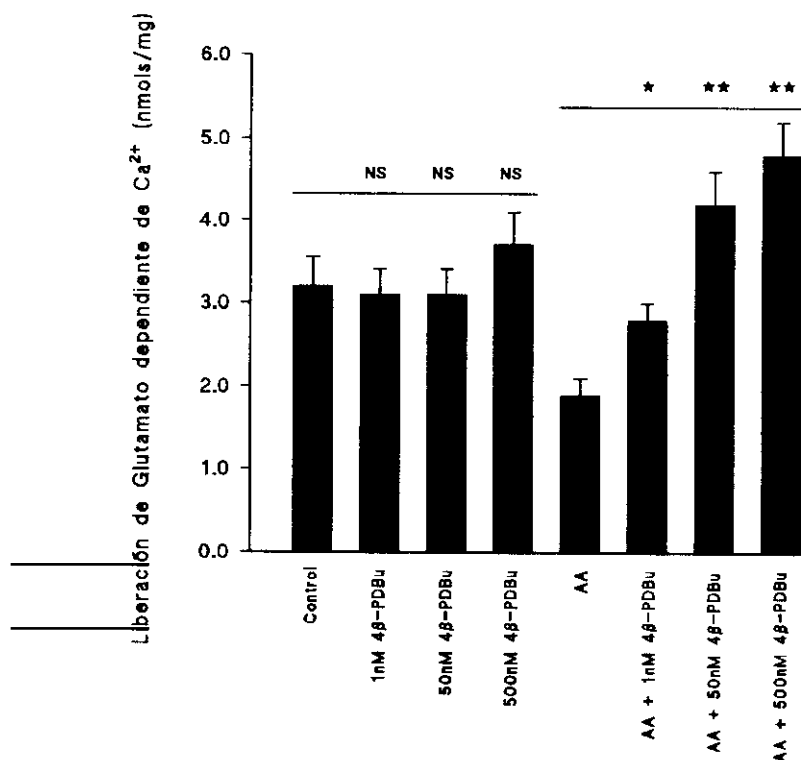


Figura 20. Potenciación de la liberación de glutamato por bajas concentraciones de ésteres de forbol en presencia de ácido araquidónico. Los sinaptosomas de la fracción P_2 (0.67 mg/1ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante 1 hora a 37°C . A continuación se centrifugaron a 12.000 xg y se resuspendieron (0.67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA. 1 ml de la suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se determinó como la diferencia entre la secreción obtenida en los 5 minutos siguientes a la despolarización en presencia de Cl_2Ca 1.33mM y en un medio con una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ de 200nM . El ácido araquidónico AA ($2\mu\text{M}$) y el éster de forbol, $4\beta\text{-PDBu}$, se añadieron 30 y 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM . Los resultados son la media \pm SEM de tres preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística de las diferencias se calculó con el test de la t de student ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; NS (no significativo).

Resultados similares se observaron cuando en lugar del éster de forbol, 4 β -PDBu, se utilizó el 1,3-di(cis)-9-octadecanoíl-glicerol, (1,3-dioleína) un diacilglicerol que también activa la proteína quinasa C. En la tabla 4 se muestra cómo el ácido araquidónico incrementa la sensibilidad de la exocitosis de glutamato a la potenciación por 1,3-dioleína, de la misma manera que concentraciones bajas de 1,3-dioleína, que carecen de efecto alguno sobre la liberación de glutamato, potencian la secreción de glutamato inducida por 4-aminopiridina 1mM, en presencia de ácido araquidónico.

<u>Liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ (nmol/mg)</u>		
	(-AA)	(+)AA
Control	3.10 \pm 0.20	1.90 \pm 0.15
Dioleína 0.2 μ M	2.85 \pm 0.25	2.20 \pm 0.20
Dioleína 0.5 μ M	3.00 \pm 0.12	3.10 \pm 0.22
Dioleína 5 μ M	3.33 \pm 0.20	3.90 \pm 0.10
Dioleína 20 μ M	3.65 \pm 0.21	4.50 \pm 0.20

Tabla 4. El ácido araquidónico incrementa la sensibilidad de la liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ a la potenciación por dioleína. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, utilizándose 1ml de esta suspensión para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ se determinó como la diferencia entre la secreción obtenida en los 5 minutos siguientes a la despolarización en presencia de Cl₂Ca 1,33mM y en un medio con una [Ca²⁺]_{ext} libre de 200nM. El ácido araquidónico, AA, (2 μ M) y la dioleína se añadieron 30 y 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM. Los resultados son la media \pm SEM de tres preparaciones de sinaptosomas.

Con el fin de determinar si el incremento en la exocitosis de glutamato observado en presencia de ácido araquidónico y 4 β -PDBu estaba mediado por la activación de la proteína quinasa C, se llevaron a cabo tres tipos de experimentos diferentes que se muestran en la figura 21. En primer lugar, los sinaptosomas se preincubaron durante 30 minutos en presencia del inhibidor de proteínas quinasas, estaurosporina a la concentración de 100nM, observándose que este inhibidor anula la potenciación de la liberación de glutamato observada en presencia de ácido

araquidónico y 4 β -PDBu 50nM. En una segunda serie de experimentos, los sinaptosomas se preincubaron con el ester de forbol PMA 1 μ M durante 30 minutos con el fin de eliminar, aunque no totalmente, la actividad de la proteína quinasa C. Este tratamiento también impidió la potenciación de la secreción de glutamato por ambos lípidos. Finalmente, se utilizó el metilaraquidonato en lugar de ácido araquidónico porque los ésteres de los ácidos grasos no son capaces de activar la proteína quinasa C, obteniéndose en este caso también una pérdida del efecto potenciador sobre la liberación de glutamato. Todos estos resultados sugieren que la potenciación de la exocitosis de glutamato por el ácido araquidónico y 4 β -PDBu estaría mediada por la activación sinérgica de la proteína quinasa C por ambos lípidos.

Con el fin de establecer el mecanismo por el cual la activación de la proteína quinasa C por el ácido araquidónico y 4 β -PDBu potencia la liberación de glutamato, se determinaron tanto la elevación de la concentración citoplásmica de Ca²⁺ como el potencial de membrana plasmática. En la figura 22A y E se muestra la elevación en la [Ca²⁺]_{cit} y la despolarización de la membrana plasmática inducida por 4-aminopiridina. La adición de ácido araquidónico reduce la elevación de [Ca²⁺]_{cit} y la despolarización de la membrana inducida por 4-aminopiridina, figuras 22B y F, mientras que por otro lado, la adición de 4 β -PDBu (500nM) afecta, sólo ligeramente, a ambos parámetros, figuras 22C y G, respectivamente. Ahora bien, la aplicación de ambos lípidos induce un aumento sustancial en la elevación [Ca²⁺]_{cit} y en la despolarización de la membrana plasmática inducidos por 4-aminopiridina (figuras 22D y H). Por tanto, estos resultados sugieren que el incremento en la liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ que se observa tras la activación sinérgica de la proteína quinasa C por el ácido araquidónico y 4 β -PDBu, podría estar mediado por un alargamiento en la duración de los potenciales de acción inducidos por 4-aminopiridina y por una mayor entrada de Ca²⁺.

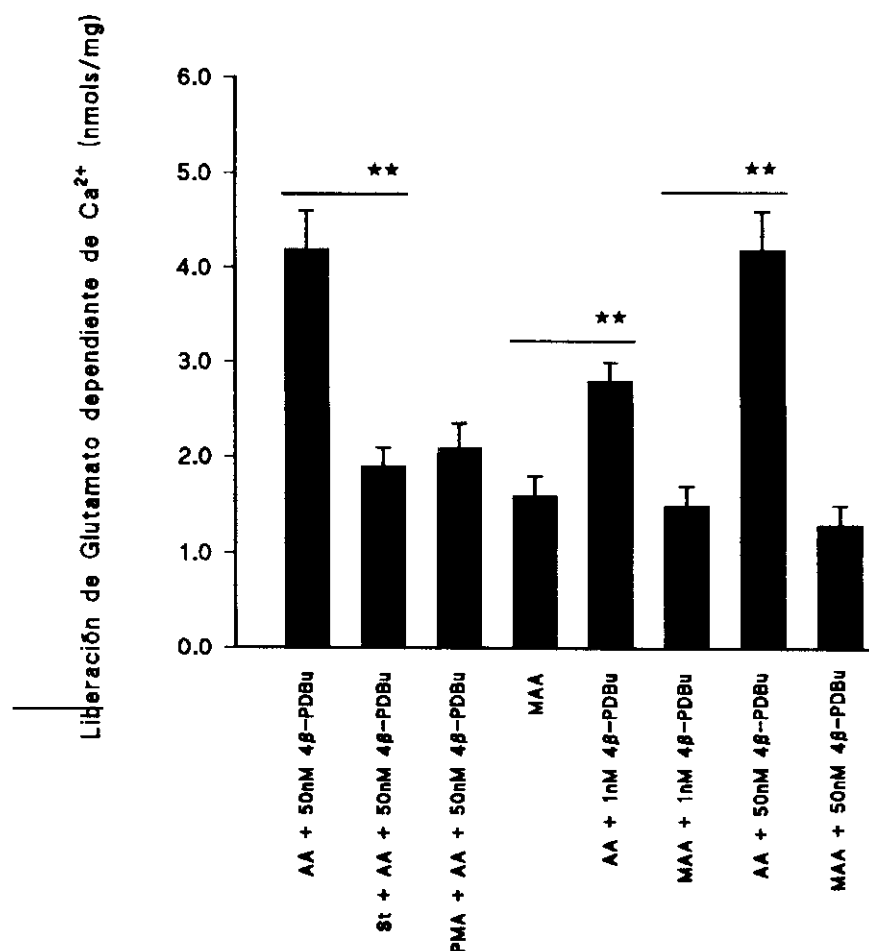


Figura 21. La potenciación de la liberación de glutamato por el ester de forbol y el ácido araquidónico es dependiente de la activación de la proteína quinasa C. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron durante una hora a 37°C. Otra serie de sinaptosomas se trataron a los 30 minutos de la incubación con estaurosporina (St) (100nM) o con PMA (1μM) continuandose las incubaciones por otros 30 minutos. Finalmente, las suspensiones se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, utilizándose 1 ml de las suspensiones para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se determinó como la diferencia entre la secreción obtenida tras 5 minutos después de despolarización en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y en un medio con una $[Ca^{2+}]_{ext}$ libre de 200nM. El ácido araquidónico, AA (2μM) o el metilaraquidonato, MAA (2μM) y el éster de forbol, 4β-PDBu se añadieron 30 y 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM. Los resultados son la media ± SEM de tres preparaciones de sinaptosomas. La significación estadística de las diferencias se calculó con el test de la t de student ** p < 0.01; * p < 0.05; NS (no significativo).

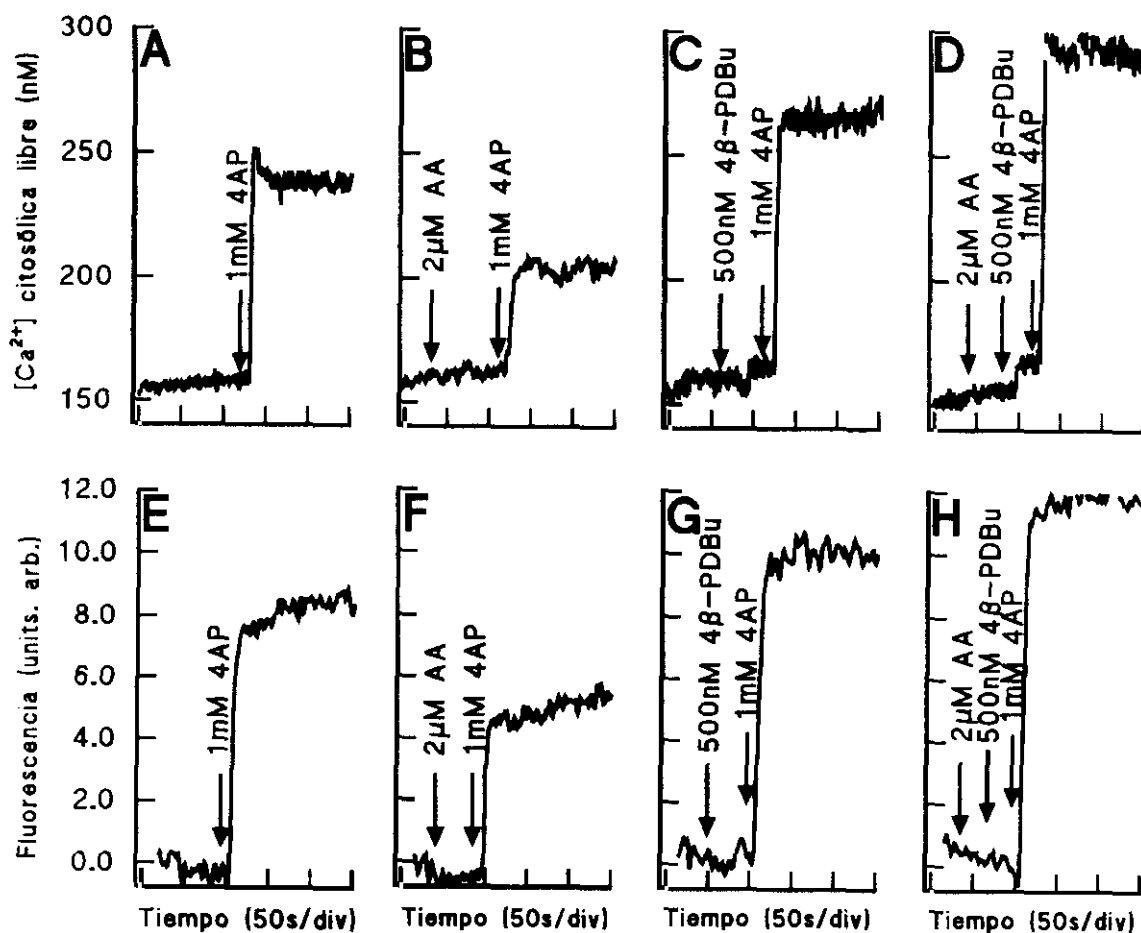


Figura 22. Efecto de los ésteres de forbol y el ácido araquidónico sobre el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre y sobre la despolarización inducida por 4-aminopiridina. En los experimentos en los que se determinó la $[Ca^{2+}]_{cit}$ libre (A-D), los sinaptosomas de la fracción P₂ (2mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron con Fura 2-AM 5μM y Cl_2Ca 1,33mM durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA y con Cl_2Ca 1,33mM. Para la determinación del potencial de membrana, (E-H), los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron durante una hora a 37°C. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y el indicador fluorescence DisC₂(5) 5μM. El ácido araquidónico, AA (2μM) y el éster de forbol, 4β-PDBu se adicionaron 30 y 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 1mM. Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos independientes.

6. Un receptor metabotrópico de glutamato facilita la liberación de glutamato.

Como se ha descrito de forma detallada en la sección 3.2 de la Introducción, una de las vías de activación de la proteína quinasa C mejor caracterizada es la de hidrólisis de los fosfatidílinosoles por la activación de ciertos receptores por sus ligandos específicos. Aunque la activación de este mecanismo de transducción de señales está bien establecido a nivel postsináptico, existen muy pocas evidencias de su existencia a nivel presináptico.

En los últimos años, se ha descrito la existencia de un receptor de glutamato, denominado metabotrópico, que está acoplado a proteínas G y a la activación de fosfolipasa C. Como resultado de la activación de este receptor se hidrolizan los fosfatidílinosoles, y se genera IP_3 y diacilglicerol como segundos mensajeros. El siguiente objetivo fué estudiar la posible existencia en las terminaciones sinápticas de un receptor metabotrópico de glutamato que acoplado al metabolismo de fosfoinosoles, generase diacilglicerol y activara la proteína quinasa C, potenciando la exocitosis de glutamato.

El (1S,3R)ACPD es el agonista más selectivo del receptor metabotrópico de glutamato (Palmer y cols. 1989). En la figura 23A se muestra que la adición de (1S,3R)ACPD $100\mu M$ no tiene efecto alguno sobre la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} . Sin embargo, en presencia de ácido araquidónico $2\mu M$, (1S,3R)ACPD estimula fuertemente la liberación de glutamato inducida por 4-AP, figura 23B. Por otra parte, el isómero (1R,3S)ACPD que es menos activo que el (1S,3R)ACPD, no potencia la exocitosis de glutamato ni en ausencia ni en presencia de ácido araquidónico. En un medio con una concentración extracelular de Ca^{2+} libre de $200nM$, (1S,3R)ACPD no modificó la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina $50\mu M$ (resultados no mostrados).

La potenciación de la liberación de glutamato por (1S,3R)ACPD en presencia de ácido araquidónico es dependiente de la concentración, como se observa en la figura 24. Concentraciones de (1S,3R)ACPD en el rango $1-100\mu M$ estimulan fuertemente la liberación de glutamato con un valor de EC_{50} de $1 \times 10^{-6} M$.

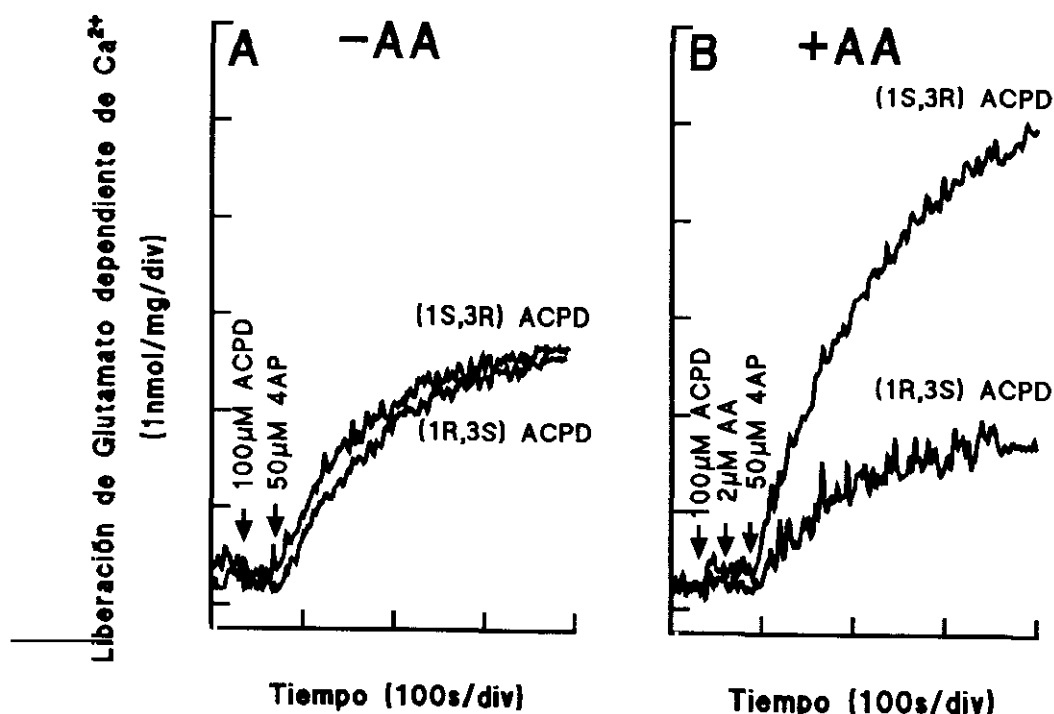


Figura 23. El agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD incrementa la liberación de glutamato inducida por 4-aminopiridina, en presencia de ácido araquidónico. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0.67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron a 37° C durante 1 hora. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0.67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, utilizándose 1 ml de esta suspensión para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ se determinó como la diferencia entre la secreción obtenida en los 5 minutos siguientes a la despolarización en presencia de Cl₂Ca 1.33mM y en un medio que contenía una [Ca²⁺]_{ext} de 200nM. Los agonistas (1S,3R)ACPD y el (1R,3S)ACPD se añadieron 60 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 50µM, en ausencia (A) o en presencia (B) de ácido araquidónico (AA) 2µM. Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos diferentes.

6.1. Caracterización farmacológica.

Tras el hallazgo de que el agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD facilita la liberación de glutamato en presencia de ácido araquidónico, el primer objetivo consistió en determinar si los efectos de este agonista eran debidos a la activación de un receptor metabotrópico. Para ello se diseñaron una serie de experimentos de farmacología que se describen a continuación. En primer lugar, se observó que otros agonistas del receptor metabotrópico como ibotenato y quisqualato también facilitan la liberación de glutamato. Así mismo, la potenciación de glutamato por (1S,3R)ACPD no fue abolida en presencia de los antagonistas selectivos de los receptores de glutamato del tipo ionotrópico, AP5 y CNQX (Davies y cols. 1981, Honoré y cols. 1987), como se observa en la figura 25.

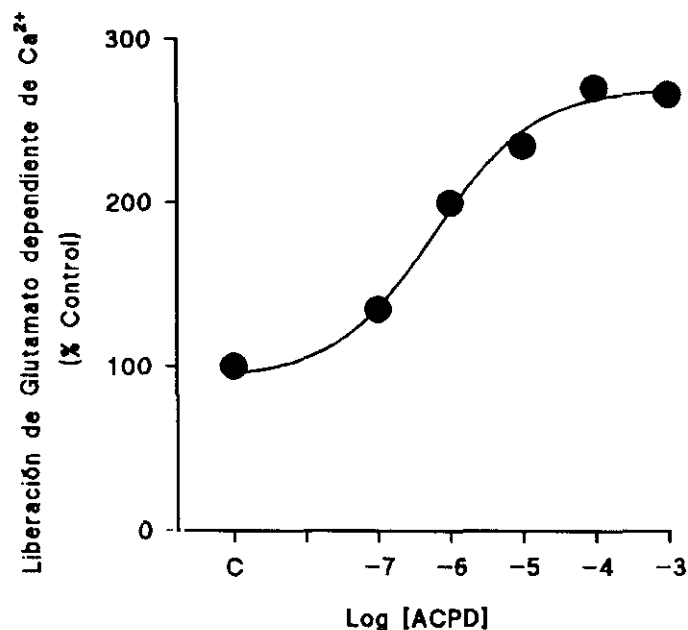


Figura 24. Curva concentración-respuesta de (1S,3R)ACPD en la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} inducida por 4-aminopiridina. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron a 37°C durante una hora. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se determinó por la diferencia entre la secreción obtenida en los 5 minutos siguientes a la despolarización en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y en un medio con una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ libre de 200nM. El agonista (1S 3R)ACPD, a diferentes concentraciones y el ácido araquidónico, AA (2 μM) se añadieron 60 s y 30 s respectivamente, antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina (50 μM). La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} control, en ausencia del agonista, C y en presencia de AA (100%) corresponde $1,20 \pm 0,11$ nmoles/mg de proteína. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

Por otro lado, el antagonista no competitivo de los receptores metabotrópicos acoplados a la hidrólisis de fosfatidilinositiles, L-AP3, a la concentración de 10 μM inhibió totalmente la estimulación de la exocitosis de glutamato inducida por (1S,3R)ACPD, figura 25. Este antagonista ha de ser utilizado con precaución ya que a concentraciones superiores 100 μM , incrementa la liberación de glutamato citoplásmico que tiene lugar en ausencia de Ca^{2+} extracelular (figura 26). Finalmente, este receptor metabotrópico parece estar acoplado a una fosfolipasa C por medio de una proteína G, sensible a la toxina pertusis (Nicoletti y cols. 1988, Schoepp y cols. 1990)) ya que el pretratamiento de los sinaptosomas con dicha toxina durante 2 horas, bloquea totalmente la potenciación de la exocitosis por (1S,3R)ACPD, figura 25. Todos estos resultados sugieren que el receptor de glutamato, presente en los terminaciones sinápticas de corteza cerebral de rata, exhibe las características típicas de un receptor metabotrópico.

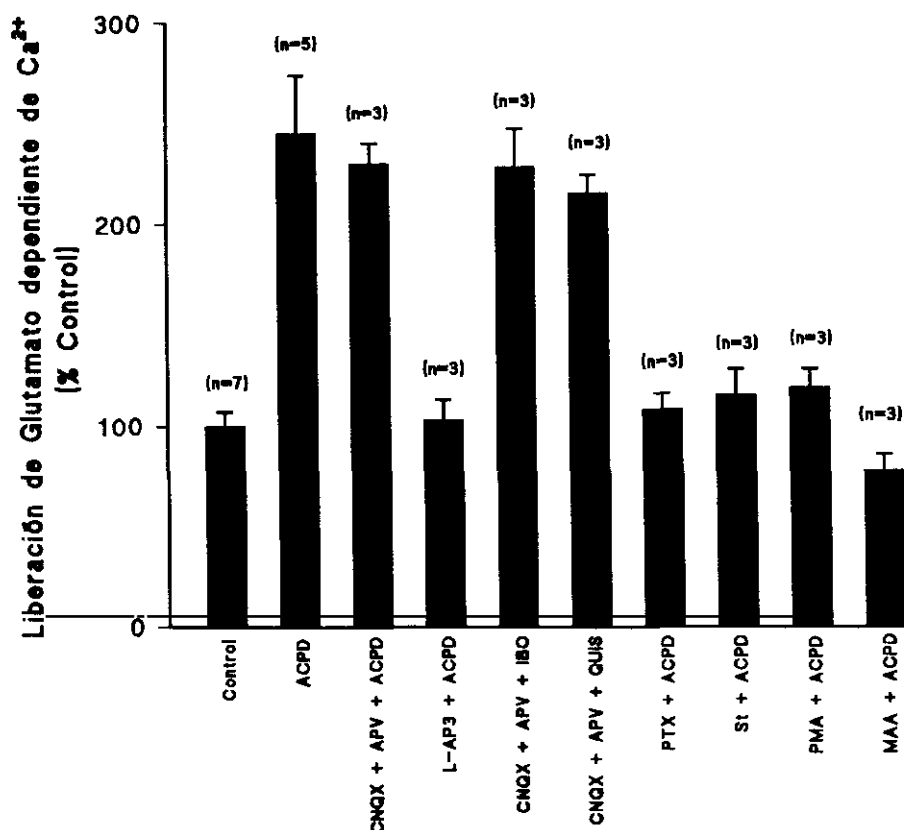


Figura 25. Caracterización farmacológica y bioquímica de la potenciación de la liberación de glutamato por (1S,3R)ACPD. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron durante una hora a 37°C. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA, utilizándose 1ml de esta suspensión para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ se determinó como la diferencia entre la secreción obtenida tras 5 minutos de despolarización en presencia de Cl₂Ca 1,33mM y en un medio con una [Ca²⁺]_{ext} libre de 200nM. En todos los experimentos (incluido el control), el ácido araquidónico, AA, 2μM se añadió 30 s antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina 50μM. Los antagonistas de receptores de glutamato, CNQX (5μM), AP5 (100μM) y L-AP3 (10μM) se añadieron dos minutos antes de la despolarización de los sinaptosomas. Los agonistas (1S, 3R)ACPD (100μM), ibotenato (100μM) y quisqualato (100μM) se adicionaron un minuto antes de inducir la despolarización. En los experimentos con toxina pertúsica, (PTX), los sinaptosomas se preincubaron durante dos horas con PTX (1,5 μg/mg proteína). En los experimentos en los que los sinaptosomas se preincubaron bien con estaurosporina (St) 100nM o con el éster de forbol PMA 1μM se precedió como se describe en la leyenda de las figuras 14 y 15. Los resultados son la media ± SEM de tres preparaciones independientes de sinaptosomas.

La figura 25 muestra también que diversos tratamientos de los sinaptosomas, bien con una alta concentración de PMA (1μM) para eliminar una gran parte de la actividad de la proteína quinasa C, bien, con el inhibidor de proteínas quinasas estaurosporina, eliminan la potenciación de la liberación de glutamato dependiente de Ca²⁺ inducidas por (1S,3R)ACPD y el ácido araquidónico.

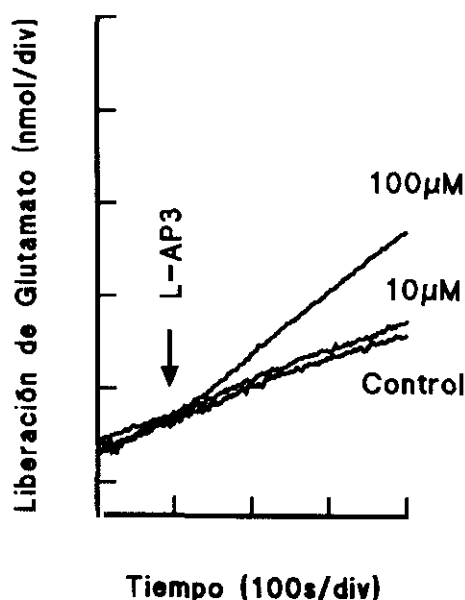


Figura 26. El antagonista del receptor metabotrópico L-AP3 aumenta la liberación basal de glutamato. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato en un medio con una $[Ca^{2+}]_{ext}$ de 200nM. El antagonista del receptor metabotrópico, L-AP3, (10µM ó 100µM) se añadió a los sinaptosomas polarizados y la liberación de glutamato se determinó durante 5 minutos, comparándose con un control en ausencia de L-AP3. Los resultados son la media de dos experimentos independientes.

6.2. Papel del ácido araquidónico en la facilitación de la liberación de glutamato por el receptor metabotrópico.

Como se ha mostrado en la figura 23, la simple activación del receptor metabotrópico por (1S,3R)ACPD no es suficiente para la potenciación de la exocitosis de glutamato inducida por 4-aminopiridina, a menos que esté presente el ácido araquidónico. Este hecho podría explicarse por la baja sensibilidad de la liberación de glutamato al diacilglicerol, el activador fisiológico de la proteína quinasa C, lo que a su vez estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado 5, donde hemos demostrado la necesidad de una activación sinérgica de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol y el ácido araquidónico para una liberación óptima de glutamato. Para comprobar ésto, los sinaptosomas se incubaron con concentraciones crecientes de 4β-PDBu, en presencia o ausencia de ácido araquidónico, determinándose los efectos en la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} . En la figura 27 se pone de manifiesto la necesidad de altas concentraciones de 4β-PDBu (0,5-1,0µM) para potenciar la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} . En cambio, en presencia de

ácido araquidónico, concentraciones de 4 β -PDBu (10-50nM), que no tenían efecto alguno sobre la exocitosis de glutamato, estimulan ahora fuertemente la liberación del neurotransmisor. La sustitución de ácido araquidónico por metilaraquidonato, que es menos eficaz que el ácido graso para activar la proteína quinasa C, anula la capacidad del éster de forbol para potenciar la exocitosis de glutamato.

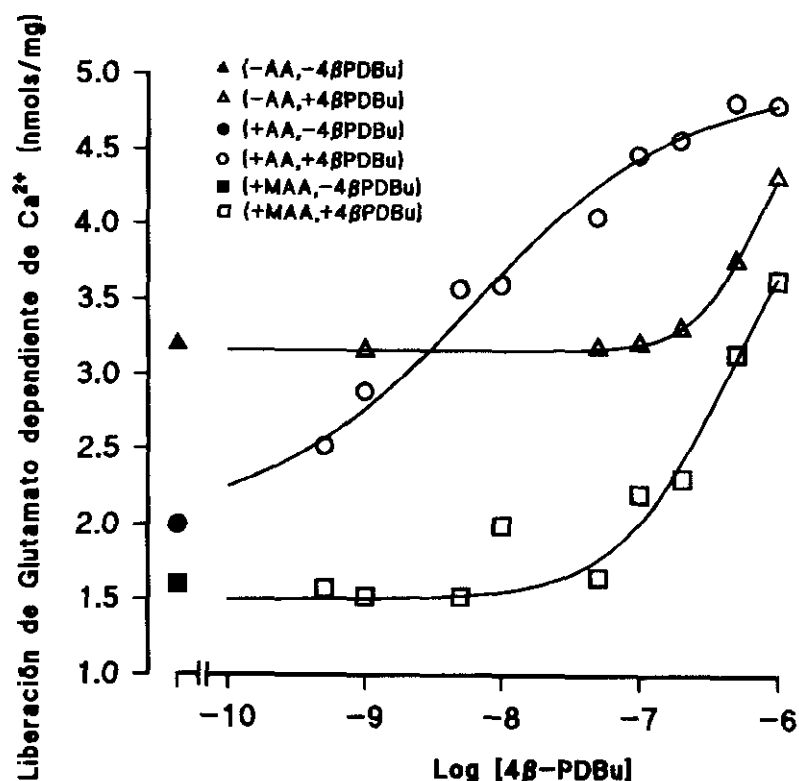


Figura 27. El ácido araquidónico incrementa la sensibilidad de la liberación de glutamato al éster de forbol, 4 β -PDBu. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67 mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato. La liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} se determinó como la diferencia entre la secreción obtenida tras 5 minutos de despolarización en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y en un medio con un $[\text{Ca}^{2+}]$ libre de 200nM. El éster de forbol, 4 β -PDBu, a diferentes concentraciones y el ácido araquidónico, AA (2 μM) o el metilaraquidonato, MAA (2 μM) se añadieron 60 s y 30 s respectivamente, antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina (50 μM). Los resultados que se muestran son la media de tres experimentos independientes.

Todos estos resultados sugieren que la potenciación de la exocitosis de glutamato por (1S,3R)ACPD en presencia de ácido araquidónico estaría mediada por

una activación sinérgica de la proteína quinasa C por el ácido graso y el diacilglicerol generado tras la estimulación del receptor metabotrópico. Por tanto, la proteína quinasa C sería la proteína clave del mecanismo facilitador de la liberación de glutamato y el ácido araquidónico desempeñaría el papel de sensibilizador de este mecanismo de transducción de señales.

6.3. Mecanismo de la potenciación de la liberación de glutamato por el receptor metabotrópico.

En experimentos paralelos, se determinaron el potencial de membrana y los cambios en la $[Ca^{2+}]_{cit}$, con el fin de conocer el mecanismo por el cual (1S,3R)ACPD potencia la liberación de glutamato. En la figura 28A y C se muestra que el ácido araquidónico reduce la despolarización de los sinaptosomas y la elevación en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducidas por 4-aminopiridina $50\mu M$. Sin embargo, la adición de (1S,3R)ACPD, en presencia de ácido araquidónico, incrementa sustancialmente tanto la despolarización de los sinaptosomas como la elevación en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducida por 4-aminopiridina, figura 28B y D. Estos resultados sugieren que el (1S,3R)ACPD y el ácido araquidónico, al igual que los ésteres de forbol, incrementarían la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} por un alargamiento o un incremento en la frecuencia de los potenciales de acción inducidos por 4-aminopiridina, que tendría como consecuencia una mayor entrada de Ca^{2+} en la terminación sináptica.

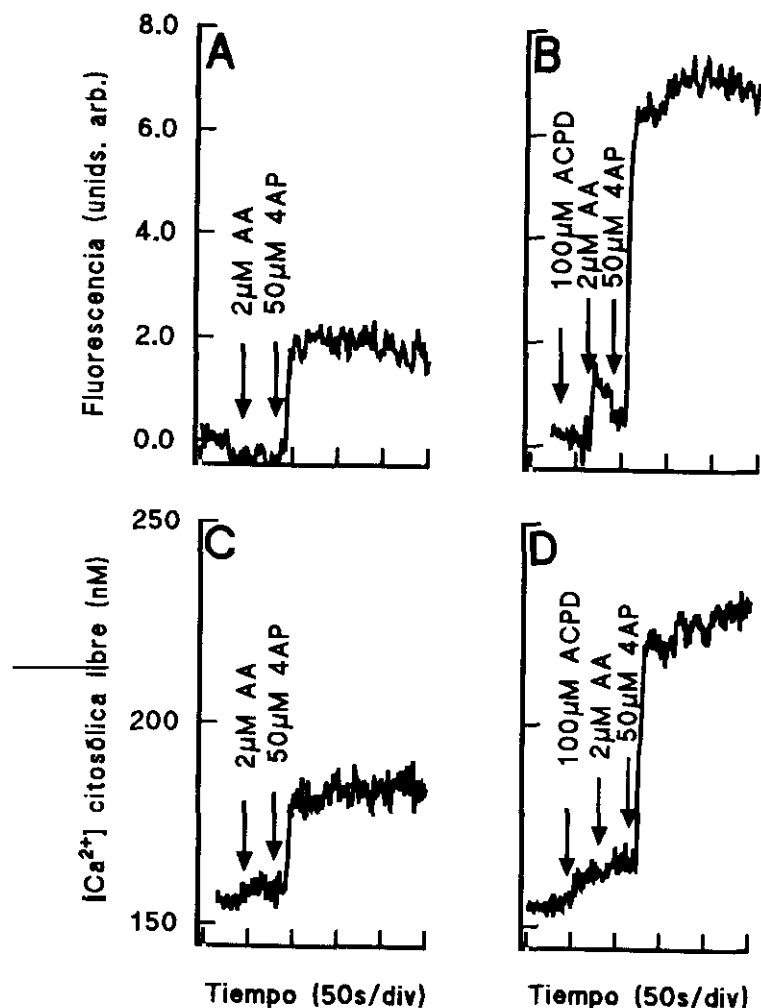


Figura 28. Efectos del agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD y del ácido araquidónico en la despolarización y en la elevación de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} libre inducidos por 4-aminopiridina. En la determinación del potencial de membrana (A y B) los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante una hora a 37°C. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA en presencia del Cl_2Ca 1,33mM y el indicador fluorescente $\text{DisC}_2(5)$ 5 μM . En la determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ libre (C y D), los sinaptosomas de la fracción P₂ (2mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron con Fura 2-AM 5 μM y Cl_2Ca 1,33mM durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts sin BSA y en presencia de Cl_2Ca 1,33mM. El agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD (100 μM) y el ácido araquidónico AA (2 μM) se adicionaron 60 s y 30 s respectivamente, antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina (50 μM). Los resultados son la media \pm SEM de tres experimentos diferentes.

6.4. El receptor metabotrópico está acoplado a la generación de diacilglicerol.

El hallazgo de que el agonista del receptor metabotrópico (1S,3R)ACPD mimetiza los efectos de la activación de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol, potenciando la liberación de glutamato, hace suponer que el receptor metabotrópico presináptico está acoplado a la generación de diacilglicerol. Con el fin de confirmar este punto, determinamos si la activación de este receptor modificaba en los niveles intrasinasaptosomales de diacilglicerol.

En la figura 29 se muestra que el agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD induce un incremento rápido y transitorio en los niveles de diacilglicerol, con un máximo en la respuesta entre 5-10 segundos después de la adición del agonista y con un incremento de al menos, diez veces sobre los niveles basales. A continuación, los niveles de diacilglicerol disminuyen progresivamente, alcanzándose valores próximos a los basales dos minutos después.

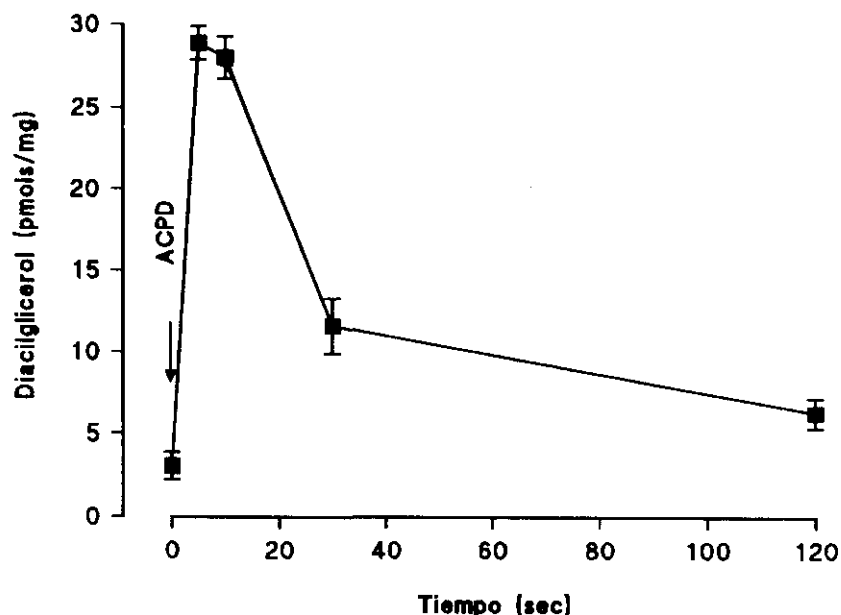


Figura 29. El agonista metabotrópico (1S, 3R)ACPD incrementa la formación de diacilglicerol en sinaptosomas. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67 mg/ml) se resuspendieron en medio de incubación Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron a 37° durante dos minutos en presencia de Cl₂Ca 1,33mM. Los niveles de diacilglicerol se estimaron en alícuotas de 500 μ ls tomadas antes y a distintos tiempos después de la adición del agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD (100 μ M) como se describe en Material y Métodos. Los resultados son la media de tres preparaciones diferentes de sinaptosomas.

Al igual que en la potenciación de la liberación de glutamato, la generación de diacilglicerol por la activación del receptor metabotrópico con (1S,3R)ACPD es dependiente de la concentración como se observa en la curva dosis-respuesta de la figura 30. La EC_{50} obtenida fue de $10\mu\text{M}$.

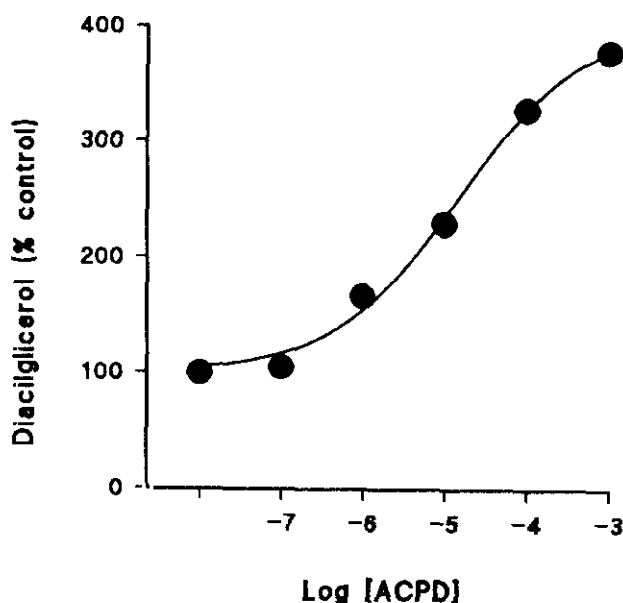


Figura 30. Curva concentración-respuesta del agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD en la generación de diacilglicerol. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67 mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron a 37° durante dos minutos en presencia de Cl₂Ca 1,33mM. Los niveles de diacilglicerol se determinaron en alícuotas tomadas 5 s después de la adición de diferentes concentraciones del agonista metabotrópico (1S,3R) ACPD, como se describe en Material y Métodos. Los resultados son la media de tres preparaciones diferentes de sinaptosomas.

En la figura 31 se observa que otros agonistas del receptor metabotrópico como ibotenato, quisqualato y el agonista endógeno, glutamato también, incrementan los niveles de diacilglicerol. Así mismo, la adición de los antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato, AP5 y CNQX no modifican el aumento en los niveles de DAG producidos por ACPD. En cambio, L-AP3 y L-AP4, antagonistas no selectivos de los receptores metabotrópicos acoplados a la hidrólisis de fosfatidilinositoles, bloquean el incremento en los niveles de diacilglicerol inducidos por (1S,3R)ACPD. Por último, la preincubación de los sinaptosomas con la toxina pertusis (PTX), bloquea parcialmente la respuesta del agonista.

La potenciación en la liberación de glutamato por (1S,3R)ACPD siempre se observa en presencia de ácido araquidónico y por ello nosotros hemos sugerido que esto es debido al requerimiento de una activación sinérgica de la proteína quinasa

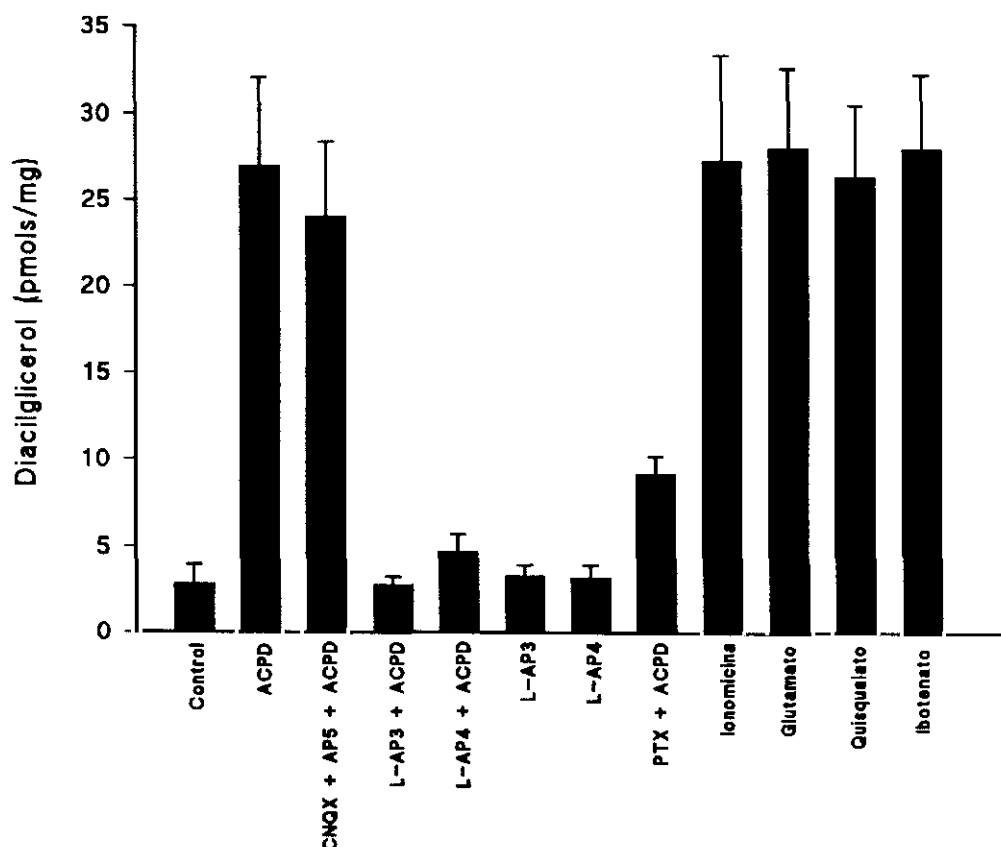


Figura 31. Caracterización farmacológica y bioquímica de la generación de diacilglicerol inducida por el agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD. Los sinaptosomas de la fracción P₂ (0,67mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se incubaron durante dos minutos en presencia de Cl₂Ca 1,33mM. Los niveles de diacilglicerol se determinaron como se describe en Material y Métodos y las alícuotas se recogieron 5 s después de la adición de los agonistas (1S,3R)ACPD (100μM), glutamato (100μM), quisqualato (100μM) e ibotenato (100μM). Los antagonistas de los receptores de glutamato, CNQX (5μM), AP5 (100μM), L-AP3 (10μM) y L-AP4 (100μM), se añadieron un minuto antes de la adición del agonista (1S,3R)ACPD. En los experimentos realizados para determinar una posible acción agonista de L-AP3 y L-AP4, se recogieron las alícuotas un minuto después de la adición de los ligandos a las concentraciones indicadas. En los experimentos con ionomicina, las muestras se recogieron dos minutos después de la adición del ionóforo de Ca²⁺. En los experimentos con toxina pertúsica (PTX), los sinaptosomas se preincubaron durante dos horas con PTX (1,5 μg/mg de proteína). Los resultados son la media ± SEM de tres preparaciones de sinaptosomas independientes.

C por el diacilglicerol y el ácido araquidónico. Sin embargo, el ácido araquidónico podría actuar también a nivel del complejo receptor-proteína G-fosfolipasa C, modificando la generación de diacilglicerol inducida por el agonista metabotrópico. Para descartar un posible efecto del ácido araquidónico en la respuesta del receptor metabotrópico se realizaron experimentos de generación de diacilglicerol en presencia o ausencia de ácido araquidónico.

En la figura 32 se observa que la despolarización de los sinaptosomas por 4-aminopiridina 50 μ M incrementa ligeramente los niveles de diacilglicerol con respecto a un control con sinaptosomas polarizados, hasta 7.01 ± 1.67 pmoles/mg de proteína. El ácido araquidónico no altera los niveles de diacilglicerol en sinaptosomas polarizados o despolarizados con 4-aminopiridina 50 μ M. El ácido araquidónico tampoco altera los niveles de diacilglicerol obtenidos tras la activación del receptor metabotrópico con (1S,3R)ACPD ni en sinaptosomas polarizados, ni en sinaptosomas despolarizados con 4-aminopiridina 50 μ M. Estos resultados sugieren que la acción del ácido araquidónico en la potenciación de la liberación de glutamato por (1S,3R)ACPD tendría lugar en algún paso posterior al complejo formado por el receptor metabotrópico-proteína G-fosfolipasa C.

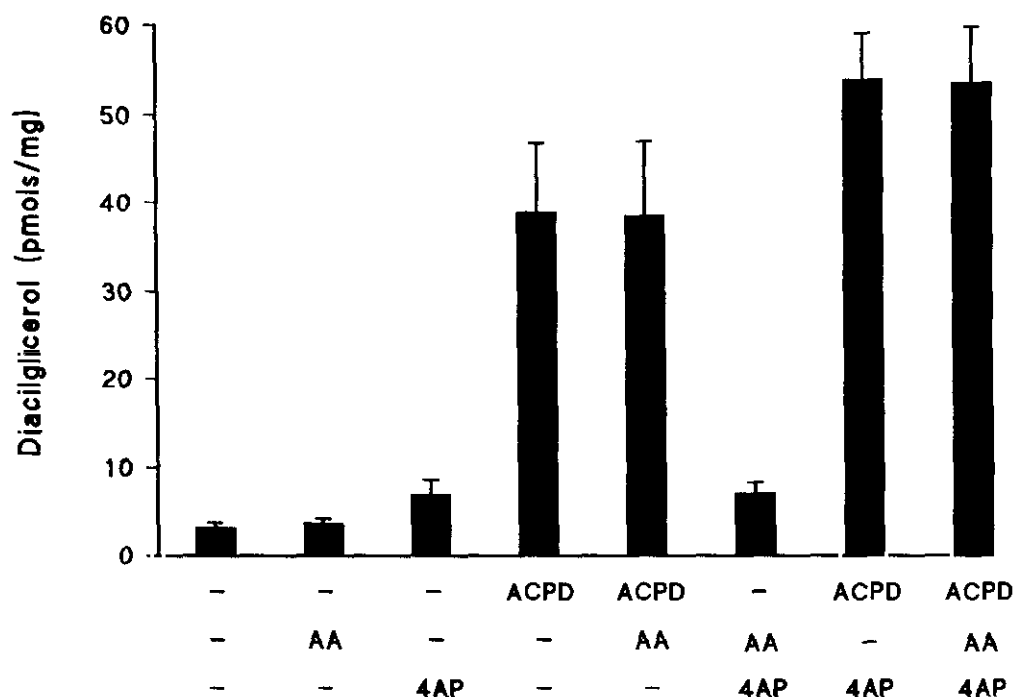


Figura 32. El ácido araquidónico no modifica la generación de diacilglicerol inducida por (1S,3R)ACPD. Los sinaptosomas purificados por Percoll (0,25mg/ml) se resuspendieron en medio Elliotts sin BSA a 37° durante dos minutos en presencia de Cl₂Ca 1,33mM. El ácido araquidónico, AA (2 μ M) y/o la 4-aminopiridina se añadieron 30 s antes del agonista metabotrópico. En aquellos experimentos en los que se determinó la generación de diacilglicerol por el ácido araquidónico y/o la despolarización con 4-aminopiridina, las alícuotas se recogieron 5 s después de estas adiciones. Los resultados son la media \pm SEM de tres experimentos diferentes.

6.5. Desensibilización del receptor metabotrópico: implicación de la proteína quinasa C.

Recientemente se ha descrito que la exposición crónica a glutamato de los receptores metabotrópicos acoplados a la hidrólisis de fosfatidílinosítoles, conlleva un proceso de desensibilización de los mismos y que este efecto es mimetizado por los ésteres de forbol (Canonico y cols. 1989, Manzoni y cols. 1990). En relación con ésto, el siguiente objetivo que nos propusimos fue investigar si la activación de la proteína quinasa C estaba también implicada en la desensibilización del receptor metabotrópico facilitador de la liberación de glutamato en las terminaciones sinápticas. Para ello, los sinaptosomas se incubaron con el éster de forbol 4 β -PDBu 10nM durante 10 minutos antes de la adición de (1S,3R)ACPD y ácido araquidónico, determinándose a continuación, de forma paralela, la liberación de glutamato y los niveles de diacilglicerol. Como control, se utilizó el éster de forbol inactivo 4 α -PDD.

En la figura 33 se observa que la activación previa de la proteína quinasa C con 4 β -PDBu suprime tanto la potenciación de la exocitosis de glutamato inducida por (1S,3R)ACPD y ácido araquidónico, como la generación de diacilglicerol inducida por el agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD; en cambio, el ester de forbol inactivo 4 α -PDD no modificó la respuesta de los sinaptosomas siendo ésta igual a la de los sinaptosomas control estimulados por (1S,3R)ACPD.

La activación del receptor metabotrópico genera diacilglicerol, el cual activa a la proteína quinasa C. Con el propósito de comprobar si la activación del receptor metabotrópico por un agonista también ponía en marcha el mecanismo de desensibilización, los sinaptosomas se incubaron durante un minuto en presencia de concentraciones crecientes de glutamato, desde 1 hasta 500 μ M. A continuación, se lavaron por centrifugación para eliminar el exceso de glutamato y se determinó la respuesta a una segunda estimulación, midiendo los niveles de diacilglicerol a los 5 segundos de la adición del agonista (1S,3R)ACPD. En la figura 34 se muestran los resultados obtenidos. La exposición de los sinaptosomas a bajas concentraciones de glutamato (1-50 μ M) no producen un cambio significativo en los niveles de diacilglicerol generados por (1S,3R)ACPD. Sin embargo, tras la exposición de los sinaptosomas a concentraciones de glutamato de 50-500 μ M se observa una drástica disminución. El mismo experimento realizado en presencia de ácido araquidónico (figura 34) pone de manifiesto que la desensibilización del receptor tiene lugar a

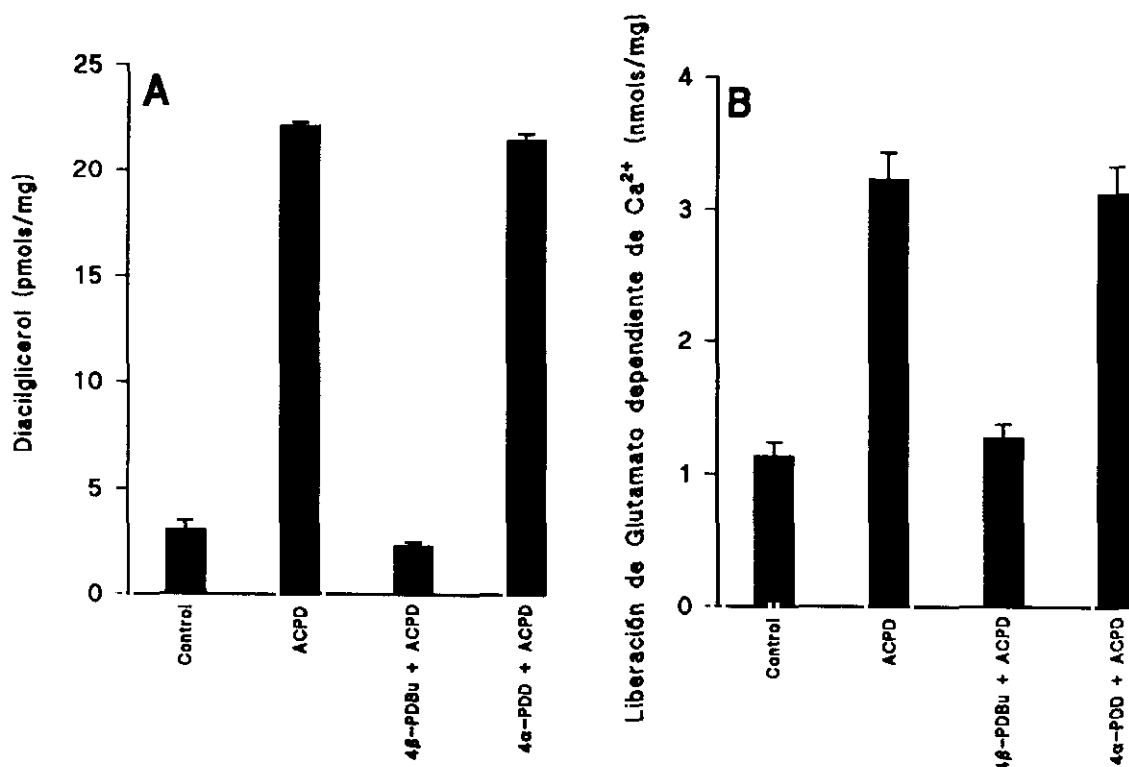


Figura 33. Los ésteres de forbol previenen la generación de diacilglicerol y la potenciación de la liberación de glutamato inducida por (1S,3R)ACPD. Los sinaptosomas de la fracción P₂ se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron durante una hora (control). En otra serie de incubaciones a los 55 minutos se añadieron los ésteres de forbol, 4 β -PDBu ó α -PDD a la concentración de 10nM y se prosiguió la incubación durante otros 5 minutos. A continuación, todas las suspensiones de sinaptosomas se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio de incubación Elliotts sin BSA. 1ml de esta suspensión se utilizó para determinar la liberación de glutamato dependiente de Ca^{2+} y que se estimó como la diferencia entre la secreción obtenida tras 5 minutos de despolarización con 4-aminopiridina 50 μ M en presencia de Cl_2Ca 1,33mM y en un medio de incubación con una $[Ca^{2+}]_{ext}$ libre de 200nM. El ácido araquidónico, AA (2 μ M) y el agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD (100 μ M) se añadieron 60 y 30 s antes de la despolarización de los sinaptosomas. Los niveles de diacilglicerol (B) se determinaron en sinaptosomas tratados como se ha indicado anteriormente, en alícuotas recogidas 5 s después de la adición de (1S,3R)ACPD (100 μ M) tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados que se muestran son la media \pm SEM de tres o cuatro experimentos independientes.

concentraciones de glutamato entre 5-50 μ M. Estos resultados sugieren que la activación de la proteína quinasa C por el propio receptor metabotrópico ejerce un control negativo sobre la actividad del receptor, seguramente por un proceso de desensibilización.

Por último, diseñamos un experimento para estudiar la posible reversibilidad del proceso de desensibilización. Con este fin, los sinaptosomas se incubaron durante

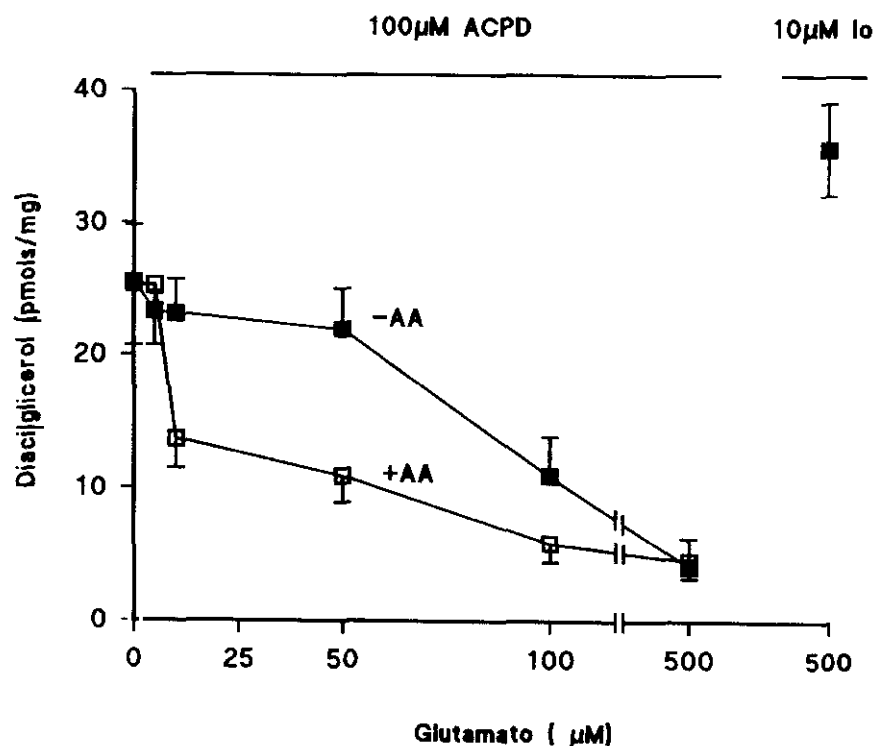


Figura 34. La preincubación de los sinaptosomas con altas concentraciones de glutamato disminuye la respuesta generadora de diacilglicerol del agonista (1S,3R)ACPD. Los sinaptosomas de la fracción P₂ se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio Elliotts sin BSA con Cl₂Ca 1,33 mM y se preincubaron con concentraciones crecientes de glutamato durante un minuto en ausencia (□) o en presencia de ácido araquidónico, AA (2μM) (■) que se añadió 30 s antes de la adición de glutamato. A continuación las suspensiones se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto para eliminar el glutamato y se resuspendieron (0,67 mg/ml) en medio de incubación que contenía Cl₂Ca 1,33 mM. Después de 2 minutos de incubación los sinaptosomas se estimularon con (1S,3R)ACPD (100μM), se recogieron alícuotas 5 s después de la adición del agonista y los niveles de diacilglicerol se estimaron como se describe en Material y Métodos. En los experimentos en los que sinaptosomas fueron estimulados con Ionomicina, las alícuotas se recogieron 120 s después de la adición del ionóforo de Ca²⁺. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

un minuto con (1S,3R)ACPD 100μM centrifugándose a continuación, para eliminar el agonista. La aplicación de un segundo estímulo de (1S,3R)ACPD se realizó a distintos tiempos después de la primera estimulación para permitir la recuperación del receptor desensibilizado. En la figura 35 se muestra que inmediatamente después de la primera estimulación, no hay una respuesta del receptor a un segundo estímulo. Sin embargo, a los diez minutos después de la primera estimulación se observa una recuperación gradual de la respuesta, que está totalmente reestablecida a los 30 minutos. La adición de un inhibidor de las proteínas fosfatasa como el ácido okadaico, (Cohen y cols. 1990) 5 minutos antes de la segunda estimulación, previene totalmente la recuperación de la respuesta, (figura 35). Estos resultados indican por tanto que fosfatasa sensibles

al ácido okadaico participan en la recuperación del receptor metabotrópico del estado desensibilizado.

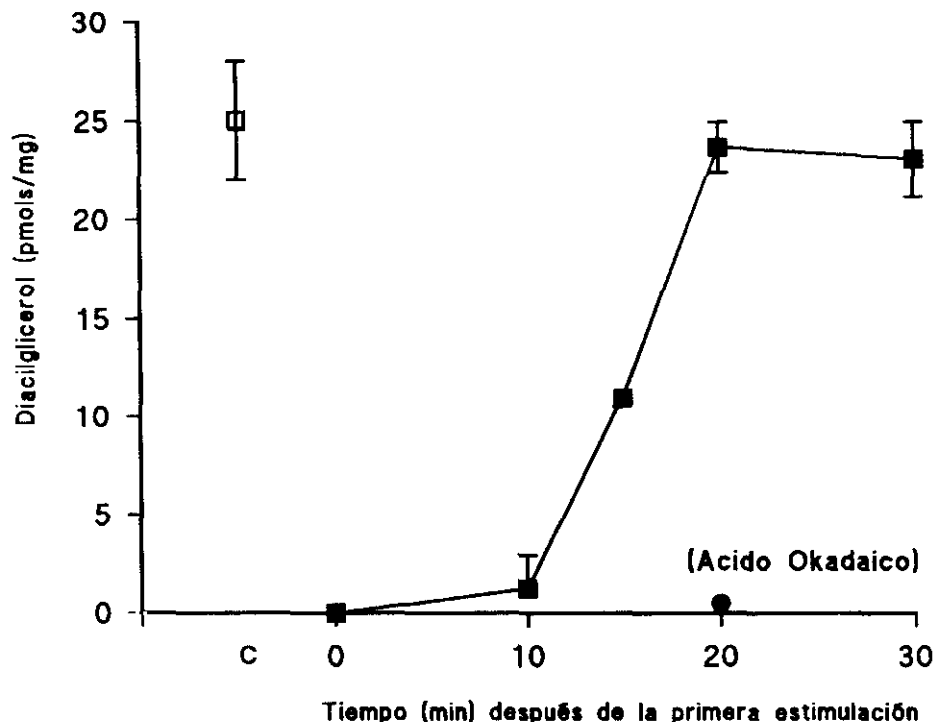


Figura 35. Recuperación de la respuesta generadora de diacilglicerol de los sinaptosomas preincubados con el agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD. Los sinaptosomas de la fracción P₂, se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts con BSA (1mg/ml) en presencia de Cl₂Ca 1,33mM y se estimularon una vez con (1S,3R)ACPD (100µM), recogiendo alícuotas a 5 s después de la adición del agonista y los niveles de diacilglicerol se estimaron según se describe en Material y Métodos, control (C). En el resto de los ensayos (■) los sinaptosomas se preincubaron con (1S,3R)ACPD 100µM durante un minuto y se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto. Los sinaptosomas se resuspendieron (0,67 mg/ml) en un medio de incubación con Cl₂Ca 1,33 mM y se estimularon de nuevo a distintos intervalos de tiempo desde la primera estimulación con (1S,3R)ACPD (100µM). Los niveles de diacilglicerol se determinaron en alícuotas recogidas 5 s después de la segunda estimulación. En algunos experimentos, los sinaptosomas se incubaron con ácido okadaico (●) (0,1 µM) que se añadió 5 minutos antes de la segunda estimulación. Los resultados son la media ± SEM de tres experimentos independientes.

6.6. Movilización de Ca²⁺ intrasinaptosomal por el agonista del receptor metabotrópico (1S,3R)ACPD.

La estimulación de los receptores metabotrópicos acoplados a la hidrólisis de fosfatidilinositol, genera diacilglicerol, que activa la proteína quinasa e inositol 1,4,5 trifosfato, IP₃, que moviliza Ca²⁺ de compartimentos intracelulares (Murphy y Miller 1988, Adamson y cols. 1990).

Con el fin de demostrar la posible existencia de la rama metabólica del IP_3 en las terminaciones sinápticas, determinamos los efectos de la estimulación del receptor metabotrópico, en la concentración citosólica de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular, como indicador de la movilización de Ca^{2+} de los compartimentos internos sinaptosomales. En presencia de Cl_2Ca 1,33mM en el medio extracelular, la incubación de los sinaptosomas durante 3 minutos con (1S,3R)ACPD no produjo cambio alguno en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ figura 36A. La adición posterior de 4-aminopiridina 50 μM , produce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de 44 ± 5.2 nM debido a la despolarización y a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. El ionóforo de Ca^{2+} , ionomicina indujo un aumento de 154 ± 10.3 nM, figura 36B sobre los niveles basales. En ausencia de Ca^{2+} extracelular, figura 36C, el agonista metabotrópico (1S,3R)ACPD tampoco produce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y en este caso y como era de esperar, la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina tampoco incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. En estas condiciones, ionomicina indujo un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de 24 ± 6.3 nM, de menor intensidad que en presencia de Ca^{2+} extracelular que podría ser debido a una movilización de Ca^{2+} de los depósitos intrasinaptosomales (figura 36D), pero cuya naturaleza no es posible identificar con el presente diseño experimental.

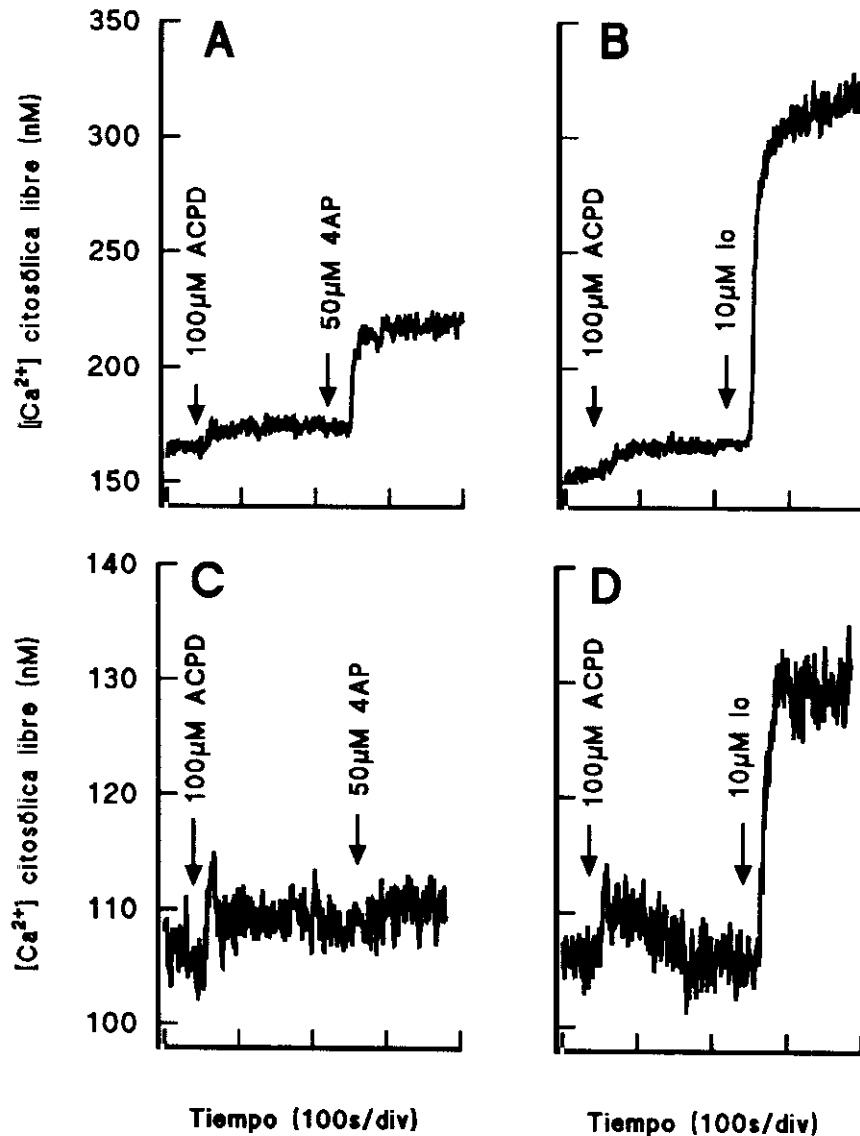


Figura 36. Efecto del agonista metabotrópico (1S,3R) ACPD sobre la concentración citosólica de Ca^{2+} libre. Los sinaptosomas de la fracción P₂ se resuspendieron (2mg/ml) en medio de incubación Elliotts con BSA (1mg/ml) y se preincubaron con Fura 2-AM 5 μ M y Cl₂Ca 1,33mM durante 30 minutos a 37°C. A continuación se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto y se resuspendieron (0,67mg/ml) en medio Elliotts en presencia de Cl₂Ca 1,33mM (A y B) ó en un medio de incubación en el se mantenía una $[Ca^{2+}]_{\text{ext}}$ libre en 200 nM (C y D). El agonista (1S,3R)ACPD (100 μ M) se añadió 3 minutos antes de la despolarización de los sinaptosomas con 4-aminopiridina (50 μ M) (A y C) o con ionomicina, Io (10 μ M) (B y D). Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

DISCUSSION

1. La proteína quinasa C potencia la exocitosis de glutamato a través de la inhibición de un canal de K^+ con características similares al rectificador retrasado.

Como se ha señalado en la Introducción, la activación de la proteína quinasa C presináptica aumenta la liberación de una gran variedad de neurotransmisores, incluido el glutamato. Sin embargo, el grado de potenciación observado varía según el tipo de preparación que se utilice. Así, en sinaptosomas de hipocampo, de cerebro entero ó de corteza cerebral, la activación de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol muestra solo un efecto marginal (10-30%) en la liberación inducida por ClK ó veratridina, que como es sabido, causan una despolarización permanente de la membrana plasmática (Lynch y Bliss, 1986, Nichols y cols. 1987, Díaz-Guerra y cols. 1988). Estos resultados contrastan con el incremento de 2 ó 3 veces en la liberación de neurotransmisores observado en los cortes de cerebro estimulados eléctricamente (Malenka y cols. 1986, Huang y cols. 1988, Gerber y cols. 1989). De estos resultados parece deducirse, por un lado, que el grado de potenciación de la liberación de neurotransmisores por la activación de la proteína quinasa C, depende del estímulo utilizado, y por otro lado, que aquellos estímulos que mejor simulan las condiciones de estimulación repetida y transitoria que tiene lugar "in vivo" son más eficaces. Numerosos estudios electrofisiológicos realizados en los cuerpos neuronales demuestran que la proteína quinasa C modula canales de Ca^{2+} y K^+ (Baraban y cols. 1985, De Reimar y cols. 1985, Brown y cols. 1989, Werz y Macdonal 1987), sin embargo, el mecanismo presináptico de potenciación de la neurosecreción no es conocido por las dificultades que conlleva el estudio de los flujos iónicos y de la secreción acoplada a Ca^{2+} en las terminaciones sinápticas.

Tibbs y cols. han descrito, recientemente, la capacidad de 4-aminopiridina, para inducir despolarizaciones transitorias y repetidas en las terminaciones sinápticas, permitiendo estimular los sinaptosomas en unas condiciones más próximas a las que tienen lugar "in vivo", evitando así, la despolarización permanente que causa las elevadas concentraciones de ClK (Tibbs y cols. 1989 a). En nuestro trabajo mostramos que la activación de la proteína quinasa C por el ester de forbol 4 β -PDBu estimula, en un 200% la exocitosis de glutamato inducida por 4-aminopiridina. Estos datos son de magnitud similar a los obtenidos en los cortes de cerebro estimulados eléctricamente, y contrastan con el ligero incremento de la exocitosis (20%) que se obtiene en los sinaptosomas estimulados con ClK (figuras 1A y C).

El mecanismo por el cual la activación de la proteína quinasa C potencia la exocitosis de glutamato se puede analizar comparando los efectos inducidos por 4-aminopiridina con los de una alta concentración de ClK. En los experimentos con ClK se pueden observar aquellos mecanismos moduladores de la liberación que están basados, bien en el control de los canales inactivables de Ca^{2+} , bien en el acoplamiento entre exocitosis y Ca^{2+} . Por el contrario, aquellos mecanismos que se basan en el control de los canales transitorios de Na^{+} y K^{+} , sólo serán observables en las condiciones de despolarizaciones transitorias inducidas por 4-aminopiridina, pero no durante la despolarización permanente producida por ClK. Aunque se ha descrito que la liberación de glutamato vesicular está fuertemente acoplada a la entrada de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (McMahon y Nicholls 1991), y que en cuerpos neuronales la proteína quinasa C modula canales de Ca^{2+} , (De Reimar y cols. 1985, Kaczmarek 1987, Strong y cols. 1987), aumentando la entrada de dicho ión; sin embargo, éste no parece ser el mecanismo responsable de la modulación positiva de la exocitosis de glutamato, ya que si así fuera, debería observarse una fuerte estimulación, por los ésteres de forbol, de la liberación inducida por ClK. Al contrario, la activación de la proteína quinasa C apenas incrementa la liberación de glutamato estimulada por ClK, de acuerdo con resultados previos obtenidos en sinaptosomas de cerebro de cobaya (Barrie y cols. 1991)

El hecho de que los ésteres de forbol potencien la exocitosis de glutamato (figura 1A) y la despolarización (figura 2D) en sinaptosomas estimulados por 4-aminopiridina indica, por un lado, que los efectos moduladores de la proteína quinasa C podrían estar basados en el control de canales transitorios, y por otro lado, que estos canales podrían ser canales de K^{+} . Así, una inhibición por proteína quinasa C de los canales de K^{+} implicados en el control de la duración de los potenciales de acción iniciados por 4-aminopiridina, aumentaría la despolarización de la población sinaptosomal, como consecuencia de un alargamiento de los potenciales de acción individuales. La mayor despolarización conllevaría una mayor entrada de Ca^{2+} , ya que los canales de Ca^{2+} acoplados a la exocitosis no se inactivan por voltaje (McMahon y Nicholls, 1990) lo que a su vez, incrementaría la exocitosis de glutamato. En este sentido hay que señalar, que son numerosos los trabajos que describen modulación de canales de K^{+} por proteína quinasa C en diversas preparaciones, como cultivos de neuronas, (Baraban y cols. 1985, Higashida y Brown 1986, Gerber y cols. 1989), células gliales (Akerman y cols. 1988, Enkvist y cols. 1989), sinapsis gigante de calamar (Osses y cols. 1989) y en sinaptosomas (Colby y

Blaustein 1988). El pequeño tamaño de las terminaciones sinápticas impide el estudio por la técnica de grapado de membrana "patch clamp" de las corrientes iónicas, lo que ha dificultado la caracterización de los flujos iónicos de la presinapsis en general, y de los canales de K^+ , en particular. Por ello, resulta difícil obtener pruebas directas acerca del tipo de canal de K^+ , que controla la proteína quinasa C que es responsable de la modulación de la exocitosis de glutamato.

En la preparación de sinaptosomas el canal de K^+ mejor caracterizado es el canal de K^+ denominado I_A que es bloqueado por 4-aminopiridina y dendrotoxina (Tibbs y cols. 1989 b). También se ha descrito la presencia de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta y baja conductancia, así como canales de K^+ tipo I_D o rectificador retrasado (Bartschat y Blaustein 1985). Es obvio señalar que el canal de K^+ tipo I_A , no es responsable de los efectos moduladores observados, ya que este canal se encuentra bloqueado en presencia de 4-aminopiridina, justamente la condición en que se observa la facilitación de la secreción de glutamato. Los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} , tampoco parecen ser los responsables del incremento en la exocitosis de glutamato, ya que, se ha observado que la apamina, un bloqueante específico de los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} de baja conductancia, no tiene efecto alguno ni en la liberación de glutamato, ni en la elevación de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducida por 4-aminopiridina en sinaptosomas de corteza cerebral de cobaya (Tibbs y cols. 1989 b). Además, y a pesar de que el bloqueante de los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} de alta conductancia, charybdotoxina, incrementa la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en sinaptosomas (Tibbs y cols. 1989 b) y en otras preparaciones neuronales (Baraban y cols. 1985, Robitaille y cols. 1992), hay que señalar que Barrie y cols. han observado que el incremento en la despolarización obtenida en presencia de los ésteres de forbol es insensible a Ca^{2+} (Barrie y cols. 1991).

No se dispone por el momento de un bloqueante específico para el canal de K^+ tipo I_D o rectificador retrasado que interviene en la terminación de los potenciales de acción. Este canal parece ser el más firme candidato para la acción de la proteína quinasa C ya que se trata de un canal transitorio que no opera en la despolarización mantenida por ClK, pero si en las despolarizaciones repetitivas inducidas por 4-aminopiridina. En este sentido, experimentos realizados en sinaptosomas con el trazador radiactivo ^{86}Rb han puesto de manifiesto que el activador de la proteína quinasa C diacilglicerol, inhibe una corriente de K^+ , sensible a voltaje y lentamente inactivable, y que farmacológicamente se corresponde a la corriente mediada por un

canal de K^+ del tipo rectificador retrasado (Colby y Blaustein 1985). Así mismo, este canal de K^+ es bastante insensible a 4-aminopiridina ya que permanece activo cuando el canal de K^+ tipo I_A es bloqueado por este agente (Cook 1988). Finalmente, estudios de electrofisiología realizados en el axón gigante del calamar, han demostrado que el canal de K^+ del tipo rectificador retrasado juega un papel clave en el control de la liberación de neurotransmisores, regulando la duración del potencial de acción y la entrada de Ca^{2+} en la presinapsis (Agustine 1990).

Aunque los datos disponibles señalan a un canal de K^+ como posible diana de las acciones de la proteína quinasa C en el control de la exocitosis de glutamato, otros mecanismos no se pueden descartar hasta disponer del análisis por la técnica de grapado de la membrana "patch clamp" de las corrientes de K^+ presinápticas. En este sentido experimentos de expresión en células ováricas del Hamster chino, han demostrado que la activación de la proteína quinasa C tiene dos efectos opuestos sobre los canales de Na^+ tipo IIA, disminuyendo la amplitud del pico, y enlenteciendo la inactivación de dicho canal (Numann y cols. 1991).

2. El ácido araquidónico inhibe la exocitosis de glutamato por un mecanismo independiente de la proteína quinasa C.

Los ácidos grasos en general, y el ácido araquidónico y sus metabolitos en particular, constituyen una nueva clase de segundos mensajeros con capacidad para modular la actividad de canales iónicos, de proteínas quinasas y la liberación de neurotransmisores (Piomelli y Greengard 1990). El ácido araquidónico puede generarse por estimulación de receptores acoplados a la fosfolipasa A_2 e hidrólisis de glicerolípidos, liberándose el ácido graso de la posición 2 y un lisofosfolípido (Felder y cols. 1990). En diversos cultivos neuronales, se ha observado que el glutamato, a través de la activación de receptores de los tipos NMDA y metabotrópico, también induce la formación y liberación de ácido araquidónico por activación de una fosfolipasa A_2 (Lazarewicz y cols. 1988, Dumuis y cols. 1988, Aramori y Nakanishi 1992). Así mismo, se ha descrito la formación de ácido araquidónico a partir del diacilglicerol formado por hidrólisis de fosfatidilinositol por la fosfolipasa C y posterior hidrólisis del diacilglicerol por acción de una diacilglicerolipasa, generándose ácido araquidónico (Irvine 1982).

En la preparación de sinaptosomas el ácido araquidónico, a bajas concentraciones (0,1-10 μ M), inhibe la exocitosis de glutamato inducida por 4-aminopiridina, pero carece de efecto sobre la liberación obtenida con altas concentraciones de ClK (figuras 9A y C). Esta acción inhibitoria es consecuencia de una reducción en la elevación de la $[Ca^{2+}]_{cit}$, que a su vez se explicaría por una disminución de la despolarización inducida por 4-aminopiridina. El hecho de que las acciones de ácido araquidónico no se observen en las condiciones de una despolarización permanente que produce ClK sugiere, que la modulación de canales transitorios son los responsables de las acciones inhibitorias del ácido graso, y más concretamente, los canales de K^+ que controlan la duración de los potenciales de acción inducidos por 4-aminopiridina. De esta manera, una reducción en la duración de los mismos, limitaría la entrada de Ca^{2+} y la liberación de neurotransmisor. En este sentido, son numerosas las evidencias que muestran la capacidad del ácido araquidónico y/o sus metabolitos para modular corrientes de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ en diversas preparaciones (Ordaway y cols. 1989, Ordaway y cols. 1990, Keyser y Alger 1990, Ehrenguber y Zahler 1991). En neuronas de hipocampo, el ácido araquidónico incrementa la permeabilidad a iones K^+ , reduciendo la excitabilidad celular (Moore y cols. 1988, Premkumar y cols. 1990). En el mismo sentido, se ha observado en *Aplysia Californica* que el ácido araquidónico y su metabolito 12-HPETE, activan canales de K^+ tipo I_s , reduciendo la liberación de neurotransmisores a nivel presináptico (Piomelli y cols. 1987 a, Piomelli y cols. 1989, Buttner y col. 1989).

La acción inhibitoria del ácido araquidónico sobre la exocitosis de glutamato está en desacuerdo con una serie de estudios realizados en sinaptosomas de hipocampo en los que se muestra que altas concentraciones de ácido araquidónico (en el rango de 30 a 400 μ M) aumentan la liberación de este neurotransmisor inducida por ClK (Lynch y Voss 1990). Ahora bien, en estos estudios no se ha hecho un control de la posible acción detergente de los ácidos grasos, de manera que la supuesta potenciación de la exocitosis, sería simplemente un desplazamiento de glutamato citoplásmico por pérdida de la integridad de la membrana sináptica, ya que según nuestros resultados concentraciones de ácido araquidónico superiores a 30 μ M incrementan la liberación basal de glutamato, siendo este efecto paralelo al incremento en la actividad del enzima láctico deshidrogenasa sinaptosomal en el medio de incubación, indicativo de la pérdida de integridad del sinaptosoma.

La acción inhibidora del ácido araquidónico sobre la exocitosis de glutamato no parece ser la consecuencia de la inhibición por este ácido graso del transportador de glutamato dependiente de Na^+ de la membrana plasmática, como se ha demostrado en sinaptosomas (Volterra y cols. 1992) y en células gliares de salamandra (Barbour y cols. 1990). Si esto fuera así, la inhibición del sistema de transporte debería manifestarse como un incremento en la liberación de glutamato independiente de Ca^{2+} , y en nuestra preparación, concentraciones de ácido araquidónico ($0,1\text{-}10\mu\text{M}$) que inhibe significativamente la exocitosis, no afecta la liberación Ca^{2+} independiente del neurotransmisor.

Los experimentos realizados con tetraetilamonio y con ésteres de forbol proporcionan dos pruebas adicionales, aunque no definitivas, acerca de que la acción inhibidora del ácido araquidónico está mediada por la activación de un canal de K^+ del tipo rectificador retrasado. La alquilamina, tetraetilamonio, por su capacidad para bloquear los canales de K^+ que controlan la duración del potencial de acción, produce en sinaptosomas control, aumentos en la liberación de glutamato, en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y en la despolarización inducidas por concentraciones submáximas de 4-aminopiridina. Estos efectos son debidos a la acción bloqueante de tetraetilamonio, sobre los canales de K^+ , lo que enlentece la repolarización, alargando por tanto, la duración del potencial de acción (Bartschat y Blaustein 1985). Como era de esperar, tetraetilamonio es capaz de revertir las acciones inhibitoras del ácido araquidónico sobre la liberación de glutamato y demás parámetros antes señalados. Por otra parte, los ésteres de forbol, que tienen efectos similares a tetraetilamonio sobre los parámetros de liberación, también son capaces de revertir las acciones inhibitoras del ácido graso. Este resultado apoyaría la conclusión de que el ácido araquidónico y la proteína quinasa C actuarían sobre la misma diana, un canal de K^+ con características similares al rectificador retrasado. Ahora bien, mientras que el ácido graso activaría el flujo de K^+ , acortando los potenciales de acción, la proteína quinasa C reduciría dicha corriente de K^+ , alargando las despolarizaciones, lo que se traduciría a su vez en una reducción y potenciación, respectivamente, de la liberación de neurotransmisor.

Los efectos opuestos del ácido araquidónico y de la activación de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol en la exocitosis de glutamato, indicarían, a primera vista, que este enzima no media las acciones del ácido graso. Sin embargo, la demostración de que algunos isoenzimas de la proteína quinasa C como la isoforma \mathcal{V} , pueden ser activadas por el ácido araquidónico y el ácido oleico en ausencia de Ca^{2+} y

fosfolípidos (Murakami y Routtenberg 1985, Murakami y cols. 1986, Shearman y cols. 1991), junto a la presencia de este isoenzima en las terminaciones sinápticas de corteza cerebral (Shearman y cols. 1991 a), nos llevaron a realizar una serie de experimentos con el fin de demostrar que la inhibición por el ácido araquidónico era independiente de proteína quinasa C. Nuestros resultados confirman que, si bien la estimulación de la exocitosis de glutamato por ésteres de forbol se pierde con tratamientos como la eliminación parcial de la actividad de la proteína quinasa C ó la presencia del inhibidor de proteínas quinasas estaurosporina, el efecto inhibidor del ácido araquidónico es insensible a estos tratamientos. Además, el metilaraquidonato, que es mucho menos eficaz que el ácido araquidónico para activar la proteína quinasa C, también inhibe la exocitosis de glutamato. Una explicación alternativa podría ser que el ácido araquidónico ó algunos de sus metabolitos oxigenados, modulasen de una forma directa los canales presinápticos de K^+ , como se ha demostrado en otras preparaciones como en neuronas de *Aplysia* (Piomelli y cols. 1987 b), en células atriales de corazón (Kim y cols. 1989), y en células de la musculatura lisa gástrica (Ordway y cols. 1989).

El ácido araquidónico tiene una vida muy corta, siendo rápidamente metabolizado a productos oxigenados por distintos sistemas enzimáticos (Shimizu y Wolfe 1990). El sistema enzimático más importante en el Sistema Nervioso Central es el sistema lipooxigenasa y algunos datos indican que varios metabolitos formados en esta vía de metabolización, fundamentalmente 12-HPETE y 12-HETE y no el ácido araquidónico, son los responsables de la modulación de la liberación de neurotransmisores. En la preparación de sinaptosomas de corteza cerebral de rata, la presencia de los inhibidores de las vías de metabolización ciclooxigenasa y monooxigenasa, indometacina y ácido norhidroguayarático, respectivamente, no anulan el efecto inhibitorio del ácido araquidónico sobre la exocitosis de glutamato, lo que parece indicar que en este caso, el propio ácido graso parece ser el responsable de la acción inhibidora sobre la exocitosis de glutamato.

3. Activación sinérgica de la proteína quinasa C, papel de los ácidos grasos insaturados.

La proteína quinasa C es una familia de isoenzimas compuesta por 10 proteínas estructuralmente relacionadas, pero con diferencias importantes en cuanto a su

distribución tisular y modo de activación (Nishizuka 1992). Estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos demuestran que las terminaciones sinápticas contienen las isoformas de proteína quinasa C α , β , γ y ϵ (Shearman y cols. 1991 a, Saito y cols. 1993). Con la excepción de la isoforma ϵ que no requiere Ca^{2+} , las demás son activadas por Ca^{2+} , fosfatidíserina y diacilglicerol, y esta activación se incrementa en presencia de ácidos grasos *cis*-insaturados (Nishizuka 1992). Las terminaciones sinápticas también contiene el isoenzima ζ (Terrian y cols. 1993), que aunque es activado por fosfatidíserina y ácidos grasos, no se afecta ni por diacilglicerol ni por ésteres de forbol ni por Ca^{2+} (Nishizuka 1992).

La facilitación de la exocitosis de glutamato por activación de la proteína quinasa C requiere concentraciones relativamente altas de ésteres de forbol (0.5-1 μM), lo que indicaría bien, una baja sensibilidad del isoenzima de proteína quinasa C acoplado a la liberación de glutamato a los ésteres de forbol, bien, que éstos compuestos no reproducen totalmente las condiciones de activación de la proteína quinasa C "in vivo". Aunque el presente estudio no permite averiguar qué subespecies de proteína quinasa C están involucradas en la facilitación de la liberación de glutamato, ha de tratarse sin duda, de una de las isoformas activadas por ácidos grasos insaturados, porque el ácido araquidónico a bajas concentraciones (2 μM) incrementa sustancialmente la sensibilidad de la maquinaria exocitótica a los ésteres de forbol y a la 1,3-dioleína (figuras 21 y tabla 4). Estos resultados estarían de acuerdo con la capacidad de los ácidos grasos *cis*-insaturados para aumentar la activación dependiente de diacilglicerol de la proteína quinasa C (Shearman y cols. 1991 b, Koide y cols. 1992) y sugerirían al mismo tiempo que la vía facilitadora de la liberación de glutamato estaría controlado por una isoforma de proteína quinasa C capaz de activarse sinérgicamente por ácido araquidónico y ésteres de forbol ó diacilglicerol.

4. Receptor metabotrópico de glutamato presináptico acoplado a la activación de la proteína quinasa C.

Una de las vías de activación de la proteína quinasa C mejor caracterizada es la que deriva de la hidrólisis de fosfatidilinosítoles de la membrana plasmática, con generación de diacilglicerol y de inositol trifosfato (IP_3). Aunque a nivel postsináptico se ha demostrado que muchos neurotransmisores ejercen sus acciones moduladoras activando esta vía de comunicación celular, no existen evidencias tan claras a nivel

presináptico. Si bien, se ha demostrado una generación de IP_3 y la movilización de Ca^{2+} intracelular acoplada a receptores muscarínicos (Audigier y cols. 1988) y a otros receptores (Adamson y cols. 1990) en sinaptosomas.

En los últimos años se ha descrito que el ácido glutámico es capaz de activar hasta cuatro tipo distintos de receptores, entre los que se encuentran los receptores denominados metabotrópicos. En este caso, las acciones del glutamato están acopladas por una proteína G bien a la activación de la fosfolipasa C e hidrólisis de fosfoinosítidos (Sladeczek y cols. 1985, Schoepp y Johnson 1989, Abe y cols. 1992), bien a una disminución ó a un incremento en los niveles de AMP_c (Schoepp y cols. 1992, Winter y Conn 1992).

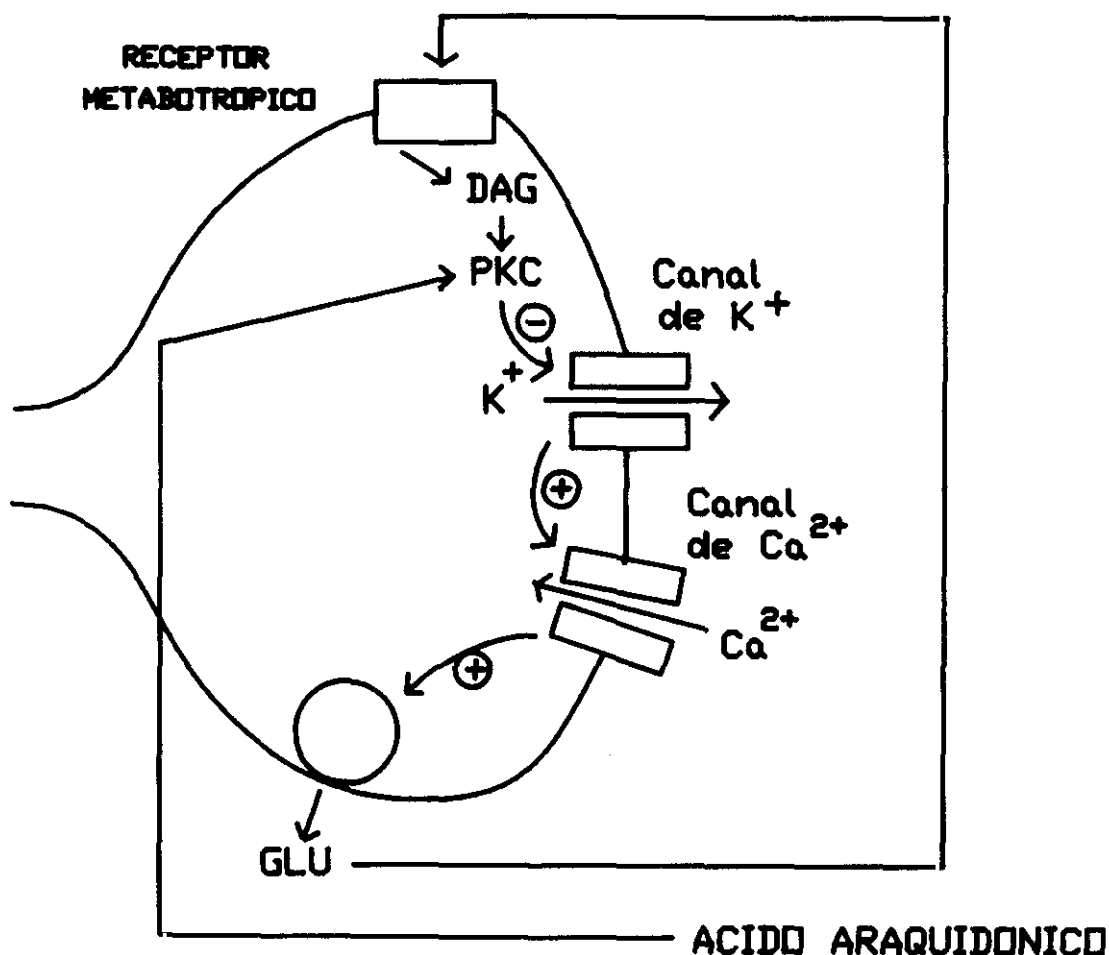
Nuestros resultados muestran que el agonista más selectivo de los disponibles para los receptores metabotrópicos, (1S,3R)ACPD (Palmer y cols. 1989), reproduce los efectos de la activación de la proteína quinasa C, induciendo un incremento en la exocitosis de glutamato, en presencia de ácido araquidónico. Este receptor presináptico ha sido caracterizado como perteneciente al tipo metabotrópico en base a observaciones que indican que (1S,3R)ACPD y otros agonistas menos selectivos como quisqualato e ibotenato, estimulan la exocitosis de glutamato, y que la adición de antagonistas selectivos de los receptores de glutamato NMDA y AMPA-kainato, y AP5 y CNQX, respectivamente, no anulan la potenciación de la liberación de glutamato por (1S,3R)ACPD. Además, el antagonista no selectivo de los receptores metabotrópicos acoplados a la hidrólisis de fosfoinosítidos (Schoepp y Johnson 1989, Schoepp y cols. 1990), L-AP3 anula totalmente la estimulación de la exocitosis de glutamato inducida por el agonista selectivo (1S,3R)ACPD. Finalmente, este receptor metabotrópico se encuentra acoplado a una proteína G sensible a toxina pertusis, como en el caso de otros receptores metabotrópicos de células granulares de cerebelo (Nicoletti y cols. 1988), sinaptoneurosomas (Recasens y cols. 1988) y cultivos de neuronas del estriado (Sladeczek y cols. 1985).

El hallazgo de que el agonista del receptor metabotrópico (1S,3R)ACPD mimetiza los efectos de la activación de la proteína quinasa C por los ésteres de forbol, sugiere que el receptor metabotrópico descrito en esta tesis doctoral esta acoplado a la generación de diacilglicerol como se demuestra en las figuras 27 y 28. Efectivamente, el agonista (1S,3R)ACPD desencadena un incremento rápido y transitorio de los niveles de diacilglicerol, con un máximo entre los 5-10 segundos

siguientes a la adición del agonista. El incremento transitorio de los niveles de diacilglicerol producido por el agonista (1S,3R)ACPD sugiere una hidrólisis de fosfoinosítidos mediada por una fosfolipasa C y no a una hidrólisis de fosfatidilcolina por acción de una fosfolipasa D y posterior hidrólisis del ácido fosfatídico por la fosfohidrolasa. Aunque la fosfolipasa D está presente en los sinaptosomas (Chalifa y cols. 1990) y se ha descrito la existencia de receptores metabotrópicos acoplados a la activación de fosfolipasa D (Boss y cols. 1993), esta segunda vía de generación de diacilglicerol parece estar implicada en una activación más tardía y duradera de la proteína quinasa C (Nishizuka 1992).

Si el diacilglicerol es el activador fisiológico de la subespecie de proteína quinasa C acoplada a la exocitosis de glutamato, cabría esperar una potenciación de la liberación del neurotransmisor tras la activación del receptor metabotrópico por (1S,3R)ACPD. Sin embargo, la simple activación del receptor metabotrópico no dispara la potenciación a menos que esté presente el ácido araquidónico (figura 24). Este hecho podría explicarse por una cierta insensibilidad de la proteína quinasa C en cuestión, al diacilglicerol generado por el receptor metabotrópico y por el requerimiento de una activación sinérgica de la proteína quinasa por el diacilglicerol y el ácido araquidónico (Shearman y cols. 1991 b, Koide y cols. 1992) para poner de manifiesto esta vía de modulación positiva. Por tanto, la proteína quinasa C parece ser la proteína clave del mecanismo facilitador de la liberación de glutamato y el ácido araquidónico sería el cebador o sensibilizador del enzima, de manera que la estimulación del receptor metabotrópico potencia la exocitosis de glutamato sólo si el ácido araquidónico está presente. Evidencias más directas de la implicación de la proteína quinasa C en la facilitación inducida por (1S,3R)ACPD y el ácido araquidónico, se han obtenido en experimentos en que tratamientos como la disminución parcial de la actividad de la proteína quinasa, el empleo de inhibidores de proteínas quinasas, estaurosporina ó la utilización de metílaraquidonato, en lugar del ácido araquidónico, conducen a una pérdida del efecto facilitador. Finalmente, hay que señalar una serie de experimentos de fosforilación de proteínas realizados en colaboración con el Dr. Nicholls de la Universidad de Dundee, pero no recogidos en esta tesis doctoral, que demuestran que la combinación del agonista (1S,3R)ACPD y del ácido araquidónico, pero no cada uno por separado, fosforilan el sustrato de la proteína quinasa C, MARCKS, en sinaptosomas de rata. Estos resultados apoyan la sugerencia previa de que una activación sinérgica de proteína quinasa C es la clave de la vía facilitadora.

Esquema 5. Facilitación de la exocitosis de glutamato mediada por la proteína quinasa C por la activación del receptor metabotrópico presináptico en presencia de ácido araquidónico.



La activación del receptor metabotrópico genera diacilglicerol, que en presencia del ácido araquidónico, activan sinérgicamente la proteína quinasa C (PKC). La proteína quinasa C bloquea un canal de K^+ (posiblemente el rectificador retrasado), prolongando la duración de los potenciales de acción, con el consiguiente aumento en la entrada de Ca^{2+} y liberación de glutamato.

El mecanismo por el cual (1S,3R)ACPD y ácido araquidónico potencian la liberación de glutamato sería el similar al de los ésteres de forbol es decir, el bloqueo del canal de K^+ rectificador retrasado y el incremento en la duración de los potenciales de acción inducidos por 4-aminopiridina. Este mecanismo de acción, estaría de acuerdo con numerosos trabajos que muestran que los receptores metabotrópicos modulan canales de K^+ . Así, por ejemplo, en cultivos de células piramidales de hipocampo, se ha observado que (1S,3R)ACPD inhibe la corriente de K^+ de los canales de K^+ dependientes de voltaje tipo I_m y canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} tipo I_{aph} , incrementando el potencial de membrana en reposo y por tanto, la excitabilidad celular (Charpak y cols. 1990, Hu y Storm 1992).

Con los datos obtenidos en esta tesis doctoral resulta difícil establecer a qué subtipo de receptor metabotrópico corresponde el receptor presináptico facilitador de la liberación de glutamato. De los seis subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato hasta ahora descritos (Nakanishi 1992), la expresión de mGluR1 y mGluR5 en oocitos de *Xenopus* y en las células ováricas de hamster chino pone de manifiesto su acoplamiento a la hidrólisis de fosfatidilinositoles (Abe y cols. 1992, Tanabe y cols. 1992); ambos subtipos de receptores metabotrópicos presentan la misma afinidad por los agonistas de los receptores metabotrópico, siendo el orden de potencia relativa (EC_{50}) quisqualato > glutamato > ibotenato > (1S,3R)ACPD. Además los dos subtipos exhiben una clara insensibilidad por el antagonista L-AP3 (Schoepp y Conn 1993). El RNA mensajero que codifica para el subtipo mGluR1 origina a su vez por procesamiento alternativo tres subtipos α , β y γ (Pin y cols. 1992). Estudios de localización mediante técnicas de hibridación con sondas de oligonucleótidos muestran que los subtipos mGluR5 y mGluR1 β se localizan en la corteza cerebral (Abe y cols. 1992, Fotuhi y cols. 1993), habiéndose mostrado además, en estudios paralelos de microscopía electrónica, que el subtipo mGluR1 β se localiza a nivel presináptico. Este subtipo de receptor podría ser el receptor metabotrópico que hemos descrito en esta tesis, sin embargo todavía no se ha podido expresar el RNA mensajero que codifica para este receptor, por lo no se sabe si constituye un receptor funcional (Fotuhi y cols. 1993). Por otro lado, los estudios farmacológicos tampoco ayudan a la identificación del receptor metabotrópico aquí descrito. Así mientras (1S,3R)ACPD es un buen agonista del receptor metabotrópico presente en los sinaptosomas de corteza cerebral, en las células del hamster chino, (1S,3R)ACPD muestra una actividad moderada (Aramori y Nakanishi 1992, Tanabe y cols. 1992). Además este receptor metabotrópico acoplado a la hidrólisis de

fosfatidilinositoles es bloqueado totalmente por L-AP3, mientras que los efectos de los receptores mGluR1 y mGluR5 no son bloqueadas por L-AP3 (Abe y cols. 1992, Tanabe y cols. 1992). Por último los estudios de sensibilidad a la toxina pertusis muestran que el receptor mGluR5 es insensible a toxina pertusis (Abe y cols. 1992), mientras que el receptor mGluR1 posee un componente sensible a esta toxina y otro insensible (Tanabe y cols. 1992). Por su parte, mGluR1 β es insensible a toxina pertusis (Pickering y cols. 1993). A la vista de estos datos, no se puede descartar la posibilidad de que el receptor metabotrópico que facilita la liberación de glutamato, corresponda a un subtipo diferente de los hasta ahora clonados y caracterizados.

Numerosos estudios han demostrado que la exposición crónica de las células a hormonas ó neurotransmisores produce una disminución de la respuesta celular por un fenómeno conocido como desensibilización. Nuestros resultados muestran que la activación de la proteína quinasa C bien, por los ésteres de forbol (figura 34) o bien, por el diacilglicerol producido tras la estimulación del receptor metabotrópico, (figura 35) previene la respuesta a una segunda estimulación, tanto en términos de generación de diacilglicerol como de potenciación de la exocitosis de glutamato. Efectos similares se han observado en los receptores metabotrópicos acoplados a la hidrólisis de fosfatidilinositoles en los cultivos de neuronas cerebelares (Catania y cols. 1991, Manzoni y cols. 1990) donde la proteína quinasa C parece ejercer un control negativo sobre la actividad de dicho receptor. La desensibilización mediada por proteína quinasa C podría ser debida a la fosforilación de algún dominio intracelular del complejo proteína G-receptor (Dohlman y cols. 1991), siendo necesaria la defosforilación mediada por fosfatasas sensibles al ácido okadaico para la recuperación del receptor metabotrópico del estado desensibilizado, ya que nuestros resultados muestran (figura 35) que en presencia de este inhibidor de fosfatasas no tiene lugar la resensibilización del receptor.

La existencia de un autoreceptor presináptico que estimula la liberación de neurotransmisores es bastante atípica, ya que la mayoría de los neurotransmisores, incluido el glutamato, están sometidos a un control negativo por autoreceptores presinápticos. Estudios electrofisiológicos realizados en las sinapsis glutamatérgicas tanto de hipocampo (Baskys y Malenka 1991) como de estriado (Lovinger 1991) han demostrado que los agonistas (1S,3R)ACPD y/o L-AP4 inhiben la transmisión sináptica y se ha sugerido la existencia de un autoreceptor de glutamato que inhibe la liberación del neurotransmisor. Ahora bien, este tipo de receptor metabotrópico es

totalmente diferente al descrito por nosotros en los sinaptosomas de corteza cerebral de rata adulta; en primer lugar, mientras que (1S,3R)ACPD y L-AP4 son buenos agonistas del receptor inhibidor (Baskys y Malenka 1991), el receptor metabotrópico facilitador solamente responde a (1S,3R)ACPD mientras que L-AP4 junto a L-AP3 se manifiestan como antagonistas (figura 32). En segundo lugar, el receptor metabotrópico inhibidor no sufre desensibilización, incluso en estimulaciones prolongadas (15 minutos) (Baskys y Malenka 1991), mientras que el receptor metabotrópico facilitador se desensibiliza rápidamente. Por último, los efectos del receptor metabotrópico inhibidor muestran una fuerte correlación negativa con la edad del animal, siendo su efecto más pronunciado en animales jóvenes (1 ó 2 semanas) que en animales adultos, donde prácticamente desaparece (Baskys y Malenka 1991) mientras que el receptor metabotrópico potenciador está presente en animales adultos (3 meses).

5. Posibles implicaciones del receptor metabotrópico facilitador de la exocitosis de glutamato.

La existencia de un sistema de control presináptico que facilite la liberación de neurotransmisores es poco frecuente, ya que en la mayoría de los casos los autoreceptores inhiben la liberación. Por tanto, cabe preguntarse cuál sería el sentido de tal mecanismo. Los recientes avances en el conocimiento de algunos mecanismos moleculares implicados en el reforzamiento de la transmisión sináptica, así como el papel del ácido araquidónico como un mensajero retrógrado intercelular, permiten sugerir que el sistema de control facilitador de la liberación glutamatérgica, descrito y caracterizado en esta tesis, podría estar implicado en los fenómenos del reforzamiento sináptico que participan en la plasticidad sináptica y en los procesos de aprendizaje y memoria.

En el hipocampo, la estimulación breve y frecuente de determinadas sinapsis glutamatérgicas de las células piramidales de las regiones CA1 y CA3 induce un aumento persistente de la eficacia sináptica, que dura horas e incluso días y semanas, en el caso de los animales que se mantienen despiertos, denominándose este fenómeno potenciación a largo plazo (PLP), del inglés Long-Term Potentiation, y conocido abreviadamente como LTP (Bliss y Lomo 1973). La condición necesaria para inducir PLP, es la aplicación de una serie de impulsos de alta frecuencia en las células

presinápticas, con el fin de despolarizar suficientemente la membrana postsináptica, para atenuar el bloqueo del receptor NMDA por el Mg^{2+} . El canal iónico asociado al receptor de NMDA conduce la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} , siendo el flujo de Ca^{2+} el responsable del inicio del reforzamiento de la transmisión sináptica, a través de la activación de diversas quinasas, como proteína quinasa C, tirosina-quinasas y otras proteínas dependientes de Ca^{2+} . Aunque la inducción de PLP tiene lugar en la célula postsináptica, no se conoce cómo puede contribuir la presinápsis a las distintas fases de la expresión de la PLP. En este sentido, hay una serie de datos derivados del análisis estadístico de la variabilidad sináptica, que sugieren que durante la PLP, hay un aumento significativo de la liberación de neurotransmisores (Malinow y Tsien, 1990). Por otro lado, los inhibidores de la proteína quinasa C, inyectados intracelularmente, 5 minutos antes de la inducción de la PLP en el área CA1 del hipocampo, carecen de efecto en el mantenimiento de la PLP. Sin embargo, cuando estos inhibidores se aplican en el medio extracelular, a los 15 y 30 minutos después de la inducción de la PLP, inhiben la PLP (Huang y cols. 1992). Estas evidencias indican la existencia de un componente presináptico que contribuye a la PLP, y que podría ser el responsable en parte de la fase de mantenimiento de PLP, a través de un incremento en la liberación del neurotransmisor. Sin embargo, la pregunta que se plantea es ¿qué señal o señales, son las determinantes de un incremento por parte de las terminaciones sinápticas en la liberación de neurotransmisores? y además ¿cómo tiene lugar esta coordinación entre la postsinapsis donde se inicia la PLP, y la presinapsis?. Inicialmente, el grupo de Bliss propuso que la célula postsináptica genera y envía un mensajero retrógrado que se propaga rápidamente fuera de la célula postsináptica, y que en la terminación nerviosa promueve la liberación del ácido glutámico (Williams y cols. 1989, Lynch y cols. 1991). Más recientemente, se han descubierto otras moléculas candidatas a este papel de mensajero retrógrado como el óxido nítrico (NO) (Böhme y cols. 1991, O'Dell y cols. 1992) y el monóxido de carbono (CO) (Zhuo y cols. 1993), que podrían desempeñar un papel relevante en fenómenos plásticos como PLP.

El ácido araquidónico se genera tras la activación de los receptores de NMDA como consecuencia de la elevación en la $[Ca^{2+}]_{\text{cit}}$ y la activación de una fosfolipasa A_2 dependiente de Ca^{2+} (Dumuis y cols. 1990). Ahora bien, ¿de qué manera el ácido araquidónico aumenta la liberación de glutamato?. El hallazgo de esta tesis doctoral, de que las terminaciones sinápticas glutamatérgicas poseen receptores de tipo metabotrópico acoplados a la generación de diacilglicerol, proporciona un posible

mecanismo por el que ácido araquidónico podría incrementar la liberación de glutamato. La unión del ácido glutámico ó de un agonista farmacológico (1S,3R)ACPD a este receptor, resulta un incremento en la liberación de este aminoácido neurotransmisor, sólo si está presente el ácido araquidónico. De esta manera, el ácido araquidónico sintonizaría los acontecimientos presinápticos con los postsinápticos. Este doble requerimiento el mecanismo facilitador implicaría además que si bien el ácido araquidónico puede propagarse desde la postsinapsis a muchas terminaciones presinápticas, el reforzamiento de la transmisión sináptica estaría limitado a las sinapsis que se han activado con anterioridad. En este sentido se ha descrito que la aplicación de ácido araquidónico, deprime la transmisión sináptica en el hipocampo y que la aplicación de (1S,3R)ACPD junto con ácido araquidónico produce un incremento transitorio de la transmisión sináptica en una primera fase (5 minutos), seguido de una potenciación más duradera (Collins y Davies, 1993). Ahora bien, para conocer en que medida el mecanismo facilitador descrito en esta tesis contribuye a la potenciación de la transmisión sináptica habrá que esperar a futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

- 1- La activación experimental, con ésteres de forbol, de la proteína quinasa C presináptica potencia la exocitosis de glutamato. Este efecto se observa mejor con aquellos agentes, como 4-aminopiridina, que simulan las condiciones de estimulación repetida y transitoria que tiene lugar "in vivo", evitando así la despolarización permanente que causa una alta concentración de ClK.
- 2- La potenciación de la exocitosis de glutamato por la activación de la proteína quinasa C está mediada por el bloqueo de un canal de K^+ , con características similares al rectificador retrasado, que controlan la duración de los potenciales de acción iniciados por 4-aminopiridina. Este bloqueo conlleva un alargamiento de los potenciales de acción inducidos por 4-aminopiridina y consecuentemente, una mayor entrada de Ca^{2+} y liberación del neurotransmisor glutamato.
- 3- El ácido araquidónico a bajas concentraciones inhibe la exocitosis de glutamato inducida por 4-aminopiridina sin afectar a la liberación de glutamato inducida por ClK. Ahora bien, concentraciones más altas de este ácido graso aumenta la liberación de glutamato por una pérdida de la integridad de la preparación sinaptosomal.
- 4- La acción inhibidora del ácido araquidónico sobre la exocitosis de glutamato es consecuencia de una reducción en la entrada de Ca^{2+} en la terminación sináptica por una disminución de la despolarización inducida por 4-aminopiridina. Este efecto se atribuye a la activación de los canales de K^+ que controlan la duración de los potenciales de acción iniciados por 4-aminopiridina.
- 5- El mecanismo por el cual el ácido araquidónico inhibe la liberación de glutamato es independiente de la activación de la proteína quinasa C y se atribuye a una modulación directa del propio ácido graso sobre los canales de K^+ . Por otro lado, el hecho de que la alquilamina, tetraetilamonio, y los ésteres de forbol sean capaces de revertir la acción inhibidora del ácido araquidónico sobre la exocitosis de glutamato, sugiere que este ácido graso y la proteína quinasa C actuarían sobre el mismo canal de K^+ , el ácido araquidónico activando el flujo de K^+ y acortando la duración de los potenciales de acción y la proteína quinasa C, reduciendo dicha corriente, y alargando la despolarización.

6- La proteína quinasa C, que esta acoplada a la potenciación de la exocitosis de glutamato, es capaz de activarse sinérgicamente por ácido araquidónico y ésteres de forbol ó 1,3-dioleína.

7- En las terminaciones sinápticas de corteza cerebral de rata hay un autoreceptor de glutamato del tipo metabotrópico, que acoplado a una proteína G y fosfolipasa C, activa el metabolismo de fosfatidilinositoles, generándose diacilglicerol, activador fisiológico de la proteína quinasa C.

8- La estimulación del receptor metabotrópico por (1S,3R)ACPD potencia la exocitosis de glutamato sólo en presencia de ácido araquidónico. Este hecho podría explicarse por una relativa insensibilidad de la proteína quinasa C de la presinapsis al diacilglicerol generado por el receptor metabotrópico y por el requerimiento de una activación sinérgica de la proteína quinasa C por el diacilglicerol y el ácido araquidónico.

9- La proteína quinasa C ejerce un control negativo sobre la actividad el receptor metabotrópico que lleva a su desensibilización, seguramente para prevenir una activación permanente de este mecanismo facilitador que pudiera terminar en una acción neurotóxica por un exceso de liberación de glutamato.

BIBLIOGRAFIA

Abe, T., Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1992): Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/ Ca^{2+} signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 267, 13361-13368.

Adamson, P., Brammer, M.J., Campbell, I.C. and Meldrum, B.S. (1989): Increases in intrasynaptosomal free $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ elicited by glutamate are mediated via a quisqualate-type receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 98, 615-622.

Adamson, P., Hajimohammadreza, I., Brammer, M.J., Campbell, I.C. and Meldrum, B.S. (1990): Presynaptic glutamate/quisqualate receptors: effects on synaptosomal free calcium concentrations. *J. Neurochem.*, 55, 1850-1854.

Adam-Vizi, V. and Ashely, R.H. (1987): Relation of acetylcholine release to Ca^{2+} uptake and intraterminal Ca^{2+} concentration in guinea pig cortex synaptosomes. *J. Neurochem.*, 49, 1013-1021.

Agustine, G.J. (1990): Regulation of transmitter release at the squid giant synapse by presynaptic delayed rectifier potassium current. *J. Physiol. (Lond.)*, 431, 343-364.

Agustine, G.J., Adler, E.M. and Charlton, M.P. (1991). The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Ann. N.Y. Sci.*, 635, 365-381.

Akerman, K.E.O., Enkvist, M.O.K. and Holopainen, I. (1988): Activators of protein kinase C and phenylephrine depolarize the astrocyte membrane by reducing the K^{+} permeability. *Neurosci. Lett.*, 92, 265-269.

Albert, K.A., Walaas, S.I., Wang, J.K.T. and Greengard, P. (1986): Widespread occurrence of "87 kDa" a major substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2822-2826.

Alder, J., Lu, B., Valtorta, F., Greengard, P. and Poo, M. (1992). Calcium-dependent transmitter secretion reconstituted in *Xenopus* Oocytes. Requirement for synaptophysin. *Science*, 257, 657-661.

Almers, V. and Tse, F.W. (1990). Transmitter release from synapses. does a preassembled fusion pore initiate exocytosis?. *Neuron*, 5, 813-818.

Aloyo, V.J., Zwiers, H. and Gispen, W.H. (1983): Phosphorylation of B-50 protein by calcium-activated phospholipid dependent protein kinase and B-50 protein kinase. *J. Neurochem.*, 41, 649-653.

Aniksztejn, L., Bregestovski, P. and Ben-Ari, Y. (1991): Selective activation of quisqualate metabotropic receptor potentiates NMDA but not AMPA responses. *Eur. J. Pharmacol.*, 205, 327-328.

Aramori, I. and Nakanishi, S. (1992): Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor mGLUR1 in transfected CHO cells. *Neuron*, 8, 757-765.

Ashely, R.H. (1986): External calcium, intrasynaptosomal free calcium and neurotransmitter release. *Biochim. Biophys. Acta.*, 854, 207-212.

- Audiger, S.M.P., Wang, J.K.T. and Greengard, P. (1988): Membrane depolarization and carbamoylcholine stimulate phosphatidylinositol turnover in intact nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2859-2863.
- Bähler, M., Benfenati, F., Valtorta, F. and Greengard, P. (1990): The synapsins and the regulation of synaptic function. *Bioessays*, 12, 259-263.
- Baraban, J.M., Synder, S.H. and Alger, B.E. (1985): PKC regulates ionic conductance in hippocampal pyramidal neurons: electrophysiological effects of phorbol esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2538-2542.
- Barbour, B., Brew, H. and Atwell, D. (1988): Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature*, 335, 433-435.
- Barbour B., Szatkowski, M., Ingledew, N. and Attwell D. (1989): Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature*, 342, 918-920.
- Barrie, A., Nicholls, D.G., Sánchez-Prieto, J. and Shira, T.S. (1991): An ion channel locus for the protein kinase C potentiation of transmitter release from guinea pig cerebrocortical synaptosomes. *J. Neurochem.*, 57, 1398-1404.
- Barrie, A.P. and Nicholls, D.G. (1993): Adenosine A₁ receptor inhibition of glutamate exocytosis and protein kinase C-mediated decoupling. *J. Neurochem.*, 60, 1081-1080.
- Bartfai, T., Iverfeldt, K., Fisone, G. and Serfözö, P. (1988): Regulation of the release of coexisting neurotransmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 28, 285-310.
- Bartschat, D.K. and Blaustein, M.P. (1985): Potassium channels in isolated presynaptic nerve terminals. *J. Physiol. (Lond.)*, 361, 419-440.
- Baskys, A. and Malenka, R.C. (1991): Agonist at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSPs in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)*, 444, 687-701.
- Beart, P. M. (1976): The autoradiographic localization of L-3H-glutamate in synaptosomal preparations. *Brain. Res.*, 103, 350-355.
- Bell, R.M. (1986): Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell*, 45, 631-632.
- Benfenati, F., Bähler, M., Jahn, R. and Greengard, P. (1989): Interactions of synapsin I with small synaptic vesicles. Distinct sites in synapsin I bind to vesicle phospholipids and vesicle proteins. *J. Cell Biol.*, 108, 1863-1872.
- Benfenati, F., Valtorta, F., Rubenstein, J.L., Gorelick, F.S., Greengard, P. and Czernik, A.J. (1992): Synaptic vesicle-associated Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature*, 359, 417-420.
- Bennet, M.K., Calakos, N. and Scheller, R.H. (1992): Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*, 257,

255-259.

Berridge, M.J. and Irvine R.F. (1989): Inositol phosphates and cell signalling. *Science*, 341, 197-205.

Betz, W.J. and Bewick, G.S. (1992): Optical analysis of synaptic vesicles recycling at the frog neuromuscular junction. *Science*, 255, 200-203.

Birch, P.J., Croddman, C.J. and Hayes, A.G. (1988): Kynurenic acid antagonizes responses to NMDA via an action at strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 151, 165-166.

Blaustein, M.P. and Goldring, J.M. (1975): Membrane potential in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *J. Physiol. (London)*, 247, 589-615.

Blaustein, M.P. (1988): Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci.*, 11, 438-443.

Blaustein, M.P., Barstschat, D.K., Benishin, C.G., Brown, W.E., Colby, K.A., Krueger, B.K., Schneider, M.J. and Sorensen, R.C. (1988): Potassium channels in rat brain synaptosomes: Pharmacology and toxicology. *Cellular and Molecular Basis of Synaptic Transmission, Nato ASI Series, H21*, 241-260.

Bliss, T.V.P. and Lomo, T. (1973): Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate gyrus of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *H. Physiol. (Lond.)*, 232, 331-356.

Böhme, G.A., Bon, C., Stutzmann, J-M., Doble, A. and Blanchard, J.C. (1991): Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.*, 199, 379-381.

Boss, V. and Conn, P.J. (1993): Metabotropic excitatory amino acid receptor activation stimulates phospholipase D in hippocampal slices. *J. Neurochem.*, 59, 2340-2343.

Boulter, J., Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Hartley, M., Deneris, E.S., Maron, C. and Heinemann, S. (1990): Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science*, 249, 1033-1037.

Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A. and Attwell, D. (1992): The glial cell glutamate uptake carrier counter transports pH-changing ions. *Nature*, 360, 471-474.

Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C. and Jahn, R. (1992). Synaptotagmin. a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, 256, 1021-1025.

Brown, D.A., Marrion, N.V. and Smart, T.G. (1989): On the transduction mechanism for muscarine-induced inhibition of M-current in cultured rat sympathetic neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, 413, 469-488.

Buma, P. (1989): Synaptic and non-synaptic release of neuromediators in the Central Nervous System. *Acta Morphol. Neerl.-Scand.*, 26, 81-113.

- Burke, S.P. and Nadler, J.V. (1988): Regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA1 area: effects of adenosine and baclofen. *J. Neurochem.*, 51, 1541-1551.
- Buttner, N., Siegelbaum, S.A. and Volterra, A. (1989): Direct modulation of *Aplysia* S-K⁺ channels by a 12-lipoxygenase metabolite of arachidonic acid. *Nature*, 342, 553-555.
- Canonico, P.L., Favit, A., Catania, M.V. and Nicoletti, F. (1988): Phorbol esters attenuate glutamate-stimulated inositol phospholipid hydrolysis in neuronal cultures. *J. Neurochem.*, 51, 1049-1053.
- Catania, M.V., Aronica, E., Sortino, M.A., Canonico, P.L. and Nicoletti, F. (1991): Desensitization of metabotropic glutamate receptors in neuronal cultures. *J. Neurochem.*, 56, 1329-1335.
- Castle, N.A., Haylett, D.G. and Jenkinson, D.H. (1989): Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci.*, 12, 59-65.
- Chalifa, V., Möhn, H. and Liscovitch, M. (1990): A neutral phospholipase D activity from rat brain synaptic plasma membranes. Identification and partial characterization. *J. Biol. Chem.*, 265, 17512-17519.
- Charpak, S., Gähwiler, B.H., Do, K.Q. and Knöfel, T. (1990): Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino acids transmitters. *Nature*, 347, 765-767.
- Choi D. W. (1988): Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channels types and role in ischemic damage. *Trends. Neurosci.*, 11, 465-469.
- Cidon S. and Sihra T.S. (1990): Characterization of a H⁺-ATPase in rat brain synaptic vesicles: coupling to L-glutamate transport. *J. Biol. Chem.*, 264, 8281-8288.
- Coffey, E.T., Sihra, T.S. and Nicholls, D.G. (1993): Protein kinase C and the regulation of glutamate exocytosis from cerebrocortical synaptosomes. *J. Biol. Chem.* (en prensa).
- Coggins, P.J. and Zwiers, H. (1991): B-50 (GAP-43): Biochemistry and functional neurochemistry of a neuron-specific phosphoprotein. *J. Neurochem.*, 56, 1095-1106.
- Cohen, P., Holmes, C.F.G. and Tsukitani, Y. (1990): Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends. Biochem. Sci.*, 15, 98-102.
- Colby, K.A. and Blaustein, M.P. (1988): Inhibition of voltage-gated K⁺ channels in synaptosomes by sn-1,2-dioctanoylglycerol, an activator of protein kinase C. *J. Neurosci.*, 8, 4685-4692.
- Collins, D.R. and Davies, S.N. (1993): Co-administration of (1S,3R)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid and arachidonic acid potentiates synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 240, 325-326.
- Cook, N.S. (1988): The pharmacology of potassium channels and their therapeutic potential. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 9, 21-28.

Cotman C.W. and Iversen L.L. (1987): Excitatory amino acids in the brain focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci.*, 10, 263-265.

Crepel, F., Daniel, H., Hermart, N. and Jaillard, D. (1991): Effects of ACPD and AP3 on parallel-fibre-mediated EPSPs of Purkinje cells in cerebellar slices in vitro. *Exp. Brain Res.*, 86, 402-406.

Curtis, D.R. and Watkins, J.C. (1960): The chemical excitation of spinal neurons by certain amino acids. *J. Physiol. (Lond.)*, 166, 1-14.

Davies, J.A., Francis, A., Jones, A.V. and Whatkins, J.C. (1981): 2-amino-5-phosphonovalerate (5APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic transmission. *Neurosci. Lett.*, 21, 77-82.

Dawson, V.L., Williams, K., Romano, C., Molinoff, P.B. and Dichter, M.A. (1990): NMDA-induced currents in hippocampal neurons can be modulated by the polyamine spermine. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 16, 541.

De Belleruche, J.S. and Bradford, H.F. (1977): On the site of origin of transmitter amino acids release by depolarization of nerve terminals in vitro. *J. Neurochem.*, 29, 335-343.

De Camilli, P. and Greengard, P. (1986): Synapsin I: a synaptic vesicle-associated neuronal phosphoproteins. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 4349-4357.

De Camilli, P., Benfenati, F., Valtorta, F. and Greengard, P. (1990): The synapsins. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 6, 433-460.

De Graan, P.N.E., Oestreicher, A.B., De Wit, M., Kroef, M., Schrama, L.H. and Gispen, W.H. (1992): Evidence for the binding of calmodulin to endogenous B-50 (GAP-43) in native synaptosomal plasma membranes. *J. Neurochem.*, 56, 2139-2141.

De Graan, P.N.E. and Gispen, W.H. (1993): The role of B-50/GAP-43 in transmitter release: studies with permeated synaptosomes. *Biochem. Soc. Trans.*, 21, 406-410.

De Reimar, S.A., Strong, J.A., Albert, K. A., Greengard, P. and Kaczmarek, L.K. (1985): Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. *Nature*, 313, 313-316.

Dekker, L.V., De Graan, P.N.E., Versteeg, D.H.G., Oestreicher, A.B. and Gispen, W.H. (1989): Inhibition of noradrenaline release by antibodies to B-50 (GAP-43). *Nature*, 342, 74-76.

Dekker, L.V., De Graan, P.N.E., De Wit, M., Hens, J.J.H. and Gispen, W.H. (1990): Depolarization-induced phosphorylation of protein kinase C substrate B-50 (GAP-43) in rat cortical synaptosomes. *J. Neurochem.*, 54, 1645-1652.

Desai, M.A. and Conn, P.J. (1991): Excitatory effects of ACPD receptors activation in the hippocampus are mediated by direct effects on pyramidal cells and blockade of synaptic transmission. *J. Neurophysiol.*, 66, 40-52.

Desai, M.A., Smith, T.S. and Conn, P.J. (1992): Multiple metabotropic glutamate receptors regulate hippocampal function. *Synapse*, 12, 206-213.

Díaz-Guerra, M.J., Sánchez-Prieto, J., Boscá, L., Pocock, J. Barrie, A. and Nicholls, D.G. (1988): Phorbol ester traslocation of protein kinase C in guinea pig synaptosomes and the potentiation of calcium-dependent glutamate release. *Biochim. Biophys. Acta.*, 970, 157-165.

Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1991): Model systems for the study of seven transmembrane-segments receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, 60, 653-688.

Docherty, M., Bradford, H.F. and Wu, J.Y. (1987): The preparation of highly purified GABAergic and cholinergic synaptosomes form mammalian brain. *Neurosci. Lett.*, 81, 232-238.

Dolphin, A.C. and Archer, E.R. (1983): An adenosine agonist inhibits and a cyclic AMP analog enhances the release of glutamate but not GABA from slices of rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.*, 43, 49-54.

Dolphin, A.C. and Prestwich, S.A. (1985): Pertussis toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release. *Nature*, 316, 148-150.

Dolphin, A.C. and Scott, R.H. (1987): Calcium channel currents ant their inhibition by (-)baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides. *J. Physiol. Lond.*, 317, 1-17.

Dumuis, A., Sebben, M., Haynes, L.L., Pin, J-P and Bockaert, J. (1988): NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature*, 336, 68-70.

Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J. and Rostas, J.A.P. (1986): A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res.*, 372, 115-129.

Eaton, S.A., Jane, D.E., Jones, P.L., Porter, R.H.P., Pook, P., Sunter, D.C., Udvarhelyi, P.M., Roberts, P.J., Salt, T.E. and Watkins, J.C. (1993): Competitive antagonism at metabotropic glutamate receptors by (s)-4-carboxyphenylglycine and (RS)- α -methyl-4-carboxyphenyl-glycine. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec.*, 244, 195-197.

Ehrengruber, M.U. and Zahler, P. (1991): Inhibition of the nicotinic ion channel by arachidonic acid and other unsaturated fatty acids in Chromaffin cells from bovine adrenal medulla. *Chimia*, 45, 45-49.

Engelsen, B. (1986): Neurotransmitter glutamate: its clinical importance. *Acta Neurobiol.*, 28, 197-276.

Enkvist, M.O.K., Holopainen, I. and Akerman, K.E.O. (1989): α -receptor-and cholinergic receptor-linked changes in cytosolic Ca and membrane potential in primary rat astrocytes. *Brain Res.*, 500, 46-54.

Erecinska, M. (1983): Aspartate transport in synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 258, 9069-9077.

Erecinska, M. and Silver, I.A. (1990): Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 35, 245-296.

- Fagg, G.E. and Foster, A.C. (1983): Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian nervous system. *Neurosci.*, 9, 701-719.
- Felder, C.C., Kanterman, R.Y., Ma, A.L. and Axelrod, J. (1990): Serotonin stimulates phospholipase A₂ and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2187-2191.
- Fogelson, A.L. and Zucker, R.S. (1985): Presynaptic calcium diffusion from various arrays of single channels. Implications for transmitter release and synaptic facilitation. *Biophys. J.*, 48, 1003-1017.
- Fonnum, F. (1984): Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42, 1-11.
- Fotuhi, M., Sharp, A.H., Glatt, C.E., Hwang, P.M., Von Krosigk, M., Synder, S.H. and Dawson, T.M. (1993): Differential localization of phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the inositol 1,4,5-triphosphate receptor in the brain. *J. Neurosci.*, 13, 2001-2012.
- Freeman, E.J., Terrian, D.M. and Dorman, R.V. (1990): Presynaptic facilitation of glutamate release from isolated hippocampal mossy fiber nerve endings by arachidonic acid. *Neurochem. Res.*, 15, 743-750.
- Freeman, E.J., Damron, D.S., Terrian, D.M. and Dorman, R.V. (1991): 12-lipoxygenase products attenuate the glutamate release and Ca²⁺ accumulation evoked by depolarization of hippocampal mossy fiber nerve endings. *J. Neurochem.*, 56, 1079-1082.
- Fykse, E.M. and Fonnum, F. (1989): Regional distribution of gamma-aminobutyrate and L-glutamate uptake into synaptic vesicles isolated from rat brain. *Neurosci. Lett.*, 99, 300-304.
- Gannon, R.L., Baty, L.T. and Terrian, D.M. (1989): L(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate inhibits the release of both glutamate and dynorphin from guinea pig but not rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain. Res.*, 495, 151-155.
- Ganong, B., Loomis, C., Hannum, Y. and Bell, R. (1986): Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1184-1187.
- Gerber, G., Kangraba, I., Ryu, P.D., Larew, J.S.A. and Randic, M. (1989): Multiple effects of phorbol esters in the rat spinal dorsal horn. *J. Neurosci.*, 9, 3606-3617.
- Girard, P.R., Mazzei, G.J., Wood, J.G. and Kuo, J.F. (1985): Polyclonal antibodies to phospholipids/Ca²⁺-dependent protein kinase and immunocytochemical localization of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3030-3034.
- Gispen, W.H., Leunissen, J.L.M., Oestreicher, A.B. Verkleij, A.J. and Zwiers, H. (1985): Presynaptic localization of B-50 phosphoprotein: the (ACTH)-sensitive protein kinase substrate involved in rat brain polyphosphoinositide metabolism. *Brain Res.*, 328, 381-385.

- Gornall, A.G., Bardewill, C.S. and David, M.M. (1947): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766.
- Graff, J.M., Young, T.N., Johnson, J.D. and Blackshear, P.J. (1989): Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 264, 21818-21823.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260, 3440-3450.
- Harrison (1990): On the presynaptic action of baclofen at inhibitory synapses between cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.*, 422, 433-446.
- Harrison, B.C. and Mobley, P. (1990): Phorbol-ester induce change in astrocyte morphology: correlation with protein kinase C activation and protein phosphorylation. *J. Neurosci. Res.*, 25, 71-80.
- Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.S. and Aderem, A. (1992): MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature*, 356, 618-622.
- Hata, Y., Davletov, B., Petrenko, A.G., Jahn, R. and Sudhof, T.C. (1993). Interaction of synaptotagmin with the cytoplasmic domains of neurexins. *Neuron*, 10, 307-315.
- Higashida, H. and Brown, D.A. (1986): Two polyphosphatidyl inositide metabolites control two currents in a neuronal cell. *Nature*, 323, 333-335.
- Hirokawa, N., Sobue, K., Kanda, A., Harada, A. and Yorifuji, H. (1989): The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J. Cell. Biol.*, 108, 111-126.
- Hollmann, M., Hartley, M. and Heinemann, S. (1991): Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252, 851-853.
- Honoré, T., Davies, S.N., Drejer, J., Flecher, E.J. and Jacobson, P. (1987): Quinoxalinediones: potent competitive non-MNDA glutamate receptor antagonist. *Science*, 241, 701-703.
- Hu, G-Y and Storm, J.F. (1992): 2-Amino-3-phosphonopropionate fails to block postsynaptic effects of metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal neurones. *Acta Physiol. Scand.*, 145, 187-191.
- Huang, H., Allgaier, C., Hertting, G. and Jackisch, R. (1988): Phorbol ester-mediated enhancement of hippocampal noradrenaline release: which ion channels are involved?. *Eur. J. Pharmacol.*, 153, 175-184.
- Huang, Y-Y, Colino, A., Selig, D.K. and Malenka, R.C. (1992): The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science*, 255, 730-733.

- Huettnner, J.E. (1990): Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and block of desensitization by ConA. *Neuron*, 5, 255-266.
- Huttner, W.B. and Greengard, P. (1979): Multiple phosphorylation sites in protein I and their differential regulation by cyclic AMP and calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5402-5406.
- Irvine, R.F. (1982): How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?. *Biochem. J.*, 204, 3-16.
- Irving, A. J., Schofield, J.G., Watkins, J.C., Sunter, D.C. and Collingridge, G.L. (1990): 1S,3R-ACPD stimulates and L-AP3 blocks Ca^{2+} mobilization in rat cerebellar neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 186, 363-365.
- Ishida, M., Saitoh, T. and Shinozaki, H. (1993a): A new metabotropic glutamate receptor agonist: developmental change of its sensitivity to receptors in the newborn rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 160, 156-158.
- Ishida, M., Saitoh, T., Ofune, Y. and Shinozaki, H. (1993b): A novel metabotropic glutamate receptor agonist: marked depression of monosynaptic excitation in the newborn rat isolated spinal cord. *Br. J. Pharmacol.*, 109, 1169-1177.
- Johnson, J.W. and Ascher, P. (1987): Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325, 529-531.
- Jones, P. G. and Roberts, P.J. (1990): Ibotenate stimulates glutamate release from guinea pig cerebrocortical synaptosomes: inhibition by L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4). *Neurosci. Lett.*, 111, 228-232.
- Kaczmarek, L.K. (1987): Protein kinase C and the regulation of ion channels and transmitter release. *Trends Neurosci.*, 10, 30-34.
- Kanai, Y. and Hediger, M.A. (1992): Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, 360, 467-470.
- Kanner, B.I. (1983): Bionergetics of neurotransmitter transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 726, 293-316.
- Kauppinen, R.A. and Nicholls, D.G. (1986): Synaptosomal bionergetics: The role of glycolysis, pyruvate oxidation and responses to hypoglycaemia. *Eur. J. Biochem.*, 158, 159-165.
- Kauppinen, R.A. and Nicholls, D.G. (1986): Synaptosomal respiration and the ability to utilize non-glycolytic substrates. *Biochem. Soc. Trans.*, 14, 361-361.
- Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T.A., Sakmann, B. and Seeburg, P.H. (1990): A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*, 249, 556-560.
- Kelly R.B. (1985): Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science*, 230, 25-32.
- Keyser, D.O. and Alger, B.E. (1990): Arachidonic acid modulate hippocampal calcium current via protein kinase C and oxygen radicals. *Neuron*, 5, 545-553.

- Kim, D. and Clapham, D.E. (1989): Potassium channels in cardiac cells activated by arachidonic acid and phospholipids. *Science*, 244, 1174-1176.
- Klapstein, G.J. and Colmers, W.F. (1992): 4-aminopyridine and low Ca^{2+} differentiate presynaptic inhibition mediated by neuropeptide Y, baclofen and 2-chloroadenosine in rat hippocampal CA1 in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 105, 470-474.
- Kleckner, N.W. and Dingledine, R. (1988): Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241, 835-837.
- Knight, D.E. and Baker, P.F. (1982): Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. Membrane Biol.*, 68, 107-140.
- Koh, J., Goldberg, M.P., Hartley, D.M. and Choi, D.W. (1990): Non-NMDA receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. *J. Neurosci.*, 10, 693-705.
- Koide, H., Ogita, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1992): Isolation and characterization of the ϵ -subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1149-1153.
- Kuffler, S.W., Nicholls, T.G. and Martin, A.M. (1984): *From neuron to brain*. Massachusetts: Sinauer.
- Lai, J.C.K. and Clark, J.B. (1976): Preparation and properties of mitochondria derived from synaptosomes. *Biochem. J.*, 154, 423-432.
- Landis, M.D.M., Hall, A.K., Weinstein, I.A. and Reese, T.S. (1988): The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron*, 1, 201-209.
- Lazarewicz, J.K., Wroblewski, J.T. and Costa, E.J. (1990): N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors induce calcium-mediated arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 55, 1875-1881.
- Lester, R.A.J. and Jahr, C.E. (1990): Quisqualate receptor-mediated depression of calcium currents in hippocampal neurons. *Neuron*, 4, 741-749.
- Linden, D.J. and Routtenberg, A. (1989): Cis-fatty acids which activate protein kinase C attenuate Na^+ and Ca^{2+} in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol. (Lond)*, 419, 95-119.
- Link, E., Edelmann, L., Chou, J.H., Binz, T., Yamasaki, S., Eisel, U., Baumert, M., Sudhof, T.C., Niemann, H. and Jahr, R. (1992): Tetanus toxin action inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 1017-1023.
- Llinás, R., Sugimori, M., Lin, J-W. and Cherskey, B. (1989): Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87, 3391-3395.
- Loomis, C.R., Walsh, P.J. and Bell, R.M. (1985): sn-1,2-diacylglycerol kinase from *Escherichia coli*. Purification, reconstitution and partial amino and carboxyl-terminal

analysis. *J. Biol. Chem.*, 260, 4091-4097.

Lovinger, D.M. (1991): Trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (t-ACPD) decreases synaptic excitation in rat striatal slices through a presynaptic action. *Neurosci. Lett.*, 129, 17-21.

Ly, A. and Michaelis, E.K. (1991): Solubilization, partial purification and reconstitution of glutamate and N-methyl-D-aspartate activated cation channels from brain synaptic membrane. *Biochemistry*, 30, 4307-4316.

Lynch, M.A. and Bliss, T.V.P. (1986): Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus of the rat: effect of calmodulin and oleyl-acetyl-glucitol on release of [³H-glutamate]. *Neurosci. Lett.*, 65, 171-176.

Lynch, M.A. and Voss, K.L. (1990): Arachidonic acid increased inositol phospholipid metabolism and glutamate release in synaptosomes prepared from hippocampal tissue. *J. Neurochem.*, 55, 215-221.

Lynch, M.A., Clements, M.P., Voss, K.L., Bramhan, C.R. and Bliss, T.V.P. (1991): Is arachidonic acid a retrograde messenger in Long-term potentiation. *Biochem. Soc. Trans.*, 19, 391-396.

MacDermott, A.B. and Dale, N. (1987): Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acids. *Trends Neurosci.*, 32, 393-404.

MacDonald, J.F. and Nowak, L.M. (1990): Mechanism of blockade of excitatory amino acid receptors channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 167-172.

Malenka, R.C., Ayoub, G.S. and Nicoll, R.A. (1986): Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature*, 321, 175-177.

Malinow, R. and Tsien, R.W. (1990): Presynaptic enhancement shown by whole-cell recording of LTP in hippocapal slices. *Nature*, 346, 177-180.

Manzoni, O.J.J., Finiels-Marlier, F., Sassetti, I., Bockaert, J., Le Peuch, C. and Sladeczek F.A.J. (1990): The glutamate receptor of Qp-type activates protein kinase C and its regulated by protein kinase C. *Neurosci. Lett.*, 109, 146-151.

Matteoli, M., Haimann, C., Torri-Tarelli, F., Polak, J.M., Ceccarelli, B. and De Camilli, P. (1988): Differential effect of alpha-latrotoxin in exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7366-7370.

Matteoli, M., Navone, F., Haimann, C., Cameron, P.L., Solimena, M. and De Camilli, P. (1989): Secretory organelles of neurons and their relationship to organelles of other cells. *Cell Biol. Int. Rep.*, 13, 981-992.

Matthew, W.D., Tsavaler, I. and Reichardt, L.F. (1981): Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *J. Cell. Biol.*, 91, 257/269.

Maycox P.R., Deckwerth T., Hell J.W. and Jahn R. (1988): Glutamate uptake by

brain synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.*, 263, 15423-14428.

Maycox P.R., Hell J.W. and Jahn R. (1990): Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *Trends. Neurosci.*, 13, 83-87.

Mayer, M.L. and Westbrook, G.L. (1987): The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 28, 197-276.

McGuinness, N., Anwyl, R. and Rowan, M. (1991): T-ACPD enhances long-term potentiation in the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, 197, 231-232.

McMahon, H.T. and Nicholls, D.G. (1990): The relationship between cytoplasmic free Ca^{2+} and the release of glutamate from synaptosomes. *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 375-377.

McMahon, H.T., and Nicholls, D.G. (1991): Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and triggering by localized Ca^{2+} . *J. Neurochem.*, 56, 86-94.

McMahon, H.T., Foran, P., Dolly, O.J., Verhage, M., Wiegant, V.R. and Nicholls, D.G. (1992): Tetanus toxin and botulinum toxins type A y B inhibit glutamate, g-aminobutyric acid, aspartate and met-enkephalin release from synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 267, 21338-21343.

Meldrum, B. and Garthwaite, J. (1990): Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 11, 379-387.

Minzt, I.M., Venema, V.J., Swiderck, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P. and Adams, M.E. (1992): P-type calcium channels blocked by the spider toxin w-Aga-IV A. *Nature*, 355, 827-829.

Monaghan, D.T., Bridges, R.J. and Cotman, C.W. (1989): The excitatory amino acids receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the Central Nervous System. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29, 365-402.

Monck, J.R. and Fernández, J.M. (1992): The exocytotic fusion pore. *J. Cell. Biol.*, 119, 1395-1404.

Moore, S.D., Madamba, S.G., Joels, M. and Siggins, G.R. (1988): Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *Science*, 239, 278-280.

Moriyosi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. and Nakanishi, S. (1992): Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354, 31-17.

Murakami, K. and Routtenberg, A. (1985): Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and calcium. *FEBS Lett.*, 192, 189-193.

Murakami, K., Chan, S.Y. and Routtenberg, A. (1986): Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca^{2+} and phospholipids. *J. Biol. Chem.* 261, 15424-15429.

Murphy, S.N. and Miller, R.J. (1988): A glutamate receptor regulates Ca^{2+}

mobilization in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8737-8741.

Nadler, J.K., White, W.F., Vaca, K.W., Redburn, D.A. and Cotman, C.W. (1977): Characterization of putative amino acid transmitter release from slices of rat dentate gyrus. *J. Neurochem.*, 29, 179-290.

Naito, S. and Ueda, T. (1983): ATP-dependent uptake of glutamate into protein-associated synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.*, 258, 696-699.

Nakanishi, S. (1992): Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 258, 597-603.

Nichols, R.A., Haycock, J.W., Wang, J.K.T. and Greengard, P. (1987): Phorbol ester enhancement of neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 48, 615-621.

Nichols, R.A., Sihra, T.S., Czernik, A.J., Nairn, A.C. and Greengard, P. (1990): Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II increases glutamate and noradrenaline release from synaptosomes. *Nature*, 343, 647-651.

Nichols, R.A., Chilcote, T.J., Czernik, A.J. and Greengard, P. (1992): Synapsin I regulates glutamate release from rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 58, 783-785.

Nicholls, D.G. (1978): Ca^{2+} -transport and proton electrochemical gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. *Biochem. J.*, 170, 511-522.

Nicholls D.G. and Akkerman K.E.O. (1981): Biochemical approaches to the study of cytosolic Ca^{2+} regulation in nerve endings. *Phil. Trans. Roy. Soc. (B)*, 296, 115-122.

Nicholls, D.G. and Sihra, T.S. (1986): Synaptosomes possess an exocytotic compartment of glutamate. *Nature*, 321, 772-773.

Nicholls, D.G., Sihra, T.S. and Sánchez-Prieto, J. (1987): Calcium-dependent and independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorimetry. *J. Neurochem.*, 49, 50-57.

Nicholls, D.G. (1989): Release of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminal. *J. Neurochem.*, 52, 331-341.

Nicholls, D.G. and Atwell, D. (1990): The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 462-468.

Nicoletti, F., Wroblewski, J.T., Fadda, E. and Costa, E. (1988): Pertussis toxin inhibits signal transduction at specific metabotropic glutamate receptor in primary cultures of cerebellar granules cells. *Neuropharmacol.*, 27, 551-556.

Nishizuka, Y. (1984): The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 308, 693-698.

Nishizuka, Y. (1986): Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233, 305-312.

- Nishizuka, Y. (1992): Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258, 607-613.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P and Tsien, R.W. (1985): Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316, 440-443.
- Numann, R., Catterall, A. and Scheuer, T. (1991): Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science*, 254, 115-118.
- Oda, T., Shearman, M.S. and Nishizuka, Y. (1991): Synaptosomal protein kinase C subspecies B. Down-regulation promoted by phorbol ester and its effect on evoked norepinephrine release. *J. Neurochem.*, 1263-1265.
- O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.C. and Arancio, O. (1991): Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11285-11289.
- Ohno, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C. Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1989): Phorbol ester binding to PKC requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 4868-4971.
- Ordway, R.W., Walsh, J.V. and Singer, J.J. (1989): Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. *Science*, 244, 1176-1179.
- Ordway, R.W., Singer, J.J. and Walsh, J.W. (1991): Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Pharmacol. Sci.*, 14, 96-100.
- Osses, L.R., Barry, S.R. and Augustine, G.J. (1989): Protein kinase C activators enhance transmission at the squid giant synapse. *Biol. Bull.*, 177, 146-153.
- Ottersen, O.P. (1989): Quantitative electron microscopic immunocytochemistry of neuroactive amino acids. *Anat. Embryol.*, 180, 1-15.
- Palmer, E., Monaghan, D.T. and Cotman, C.W. (1989): Trans-ACPD, a selective agonist of the phosphoinositide coupled excitatory amino acid receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 166, 585-587.
- Patel, J., Moore, W.C., Thompson, C., Keith, R.A. and Salama, A.I. (1990): Characterization of the quisqualate receptor linked to phosphoinositide metabolism during development. *Dev. Brain Res.*, 51, 132-134.
- Patton, B.L., Miller, S.G. and Kennedy, M.B. (1990): Type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase by Ca^{2+} /calmodulin is inhibited by autophosphorylation of threonine within the calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 265, 11204-11212.
- Pearce, B., Albrecht, J., Morow, C. and Murphy, S. (1986): Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neurosci. Lett.*, 72, 335-340.
- Pickering, D.S., Thomsen, C., Suzdak, P.D., Fletcher, E.J., Robitaille, R., Salter, M.W., MacDonald, J.F., Huang, X-P. and Hampson, D.R. (1993): A comparison of two alternative spliced forms a metabotropic glutamate receptor coupled to

phosphoinositide turnover. *J. Neurochem.*, 61, 85-92.

Pin, J-P, Waeber, C., Prezeau, L., Bockaert, J. and Heinemann, F. (1992): Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* Oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10331-10335.

Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepseel, H., Storm-Mathissen, J., Seeberg, E. and Kanner, B.I. (1992): Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, 360, 464-467.

Piomelli, D., Volterra, A., Dale, N., Seigelbaum, S.A., Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Belardetti, F. (1987) a: Lipoygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of *Aplysia* sensory neurons. *Nature*, 328, 38-43.

Piomelli, D., Shapiro, E., Feinmark, S.J. and Schwartz, J.H. (1987) b: Metabolites of arachidonic acid in the nervous system of *Aplysia*: possible mediators of synaptic modulation, *J. Neurosci.*, 7, 3675-3686.

Piomelli, D., Wang, J.K.T., Shira, T.S., Nairn, A.C., Czernik, A.J. and Greengard, P. (1989): Inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by arachidonic acid and its metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8550-8554.

Piomelli, D. and Greengard, P. (1990): Lipoygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 367-373.

Pocock, J., Murphie, H.M. and Nicholls, D.G. (1988): Kainic acid inhibits the synaptosomal plasma membrane glutamate carrier and allows glutamate leakage from the cytoplasm but does not affect glutamate exocytosis. *J. Neurochem.*, 50, 745-751.

Pocock, J.M. and Nicholls, D.G. (1992): A toxin (Aga-GI) from the venom of the spider *Agelenopsis aperta* inhibits the mammalian presynaptic Ca^{2+} channel coupled to glutamate exocytosis. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec.*, 226, 343-350.

Premkumar, L.S., Gage, P.W. y Chung, S-H. (1990): Coupled potassium channels induced by arachidonic acid in cultured neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 42, 17-22.

Prezeau, L., Manzoni, O., Homburger, V., Sladeczek, F., Curry, K. and Bockaert, J. (1992): Characterization of metabotropic glutamate receptor: direct negative coupling to adenylyl cyclase and involvement of a pertussis toxin-sensitive G-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8040-8044.

Rainnie, D.G. and Shinnick-Gallagher, P. (1992): Trans-ACPD and L-APB presynaptically inhibit excitatory glutamatergic transmission in the basolateral amygdala (BLA). *Neurosci. Lett.*, 139, 87-91.

Recasens, M., Sasetti, I., Nourigat, A., Sladeczek, F. and Bockaert, J. (1988): Characterization of subtypes of excitatory amino acid receptors involved in the stimulation of inositol phosphate synthesis in rat brain synaptoneurosomes. *Eur. J. Pharmacol.*, 141, 87-93.

Rhoads, D.E., Ockner, R.K., Peterson, N.A. and Raghupathy, E. (1983): Modulation of membrane transport by free fatty acids inhibition of synaptosomal

sodium-dependent amino acid uptake. *Biochemistry*, 22, 1965-1970.

Roberts, E. and Frankel, S. (1950): gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 187, 55-63.

Robitaille, R. and Charlton, M.P. (1992): Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.*, 12, 297-305.

Rosenthal, I. and Meldonesi, J. (1989): α -Latrotoxin and related toxins. *Pharmac. Ther.*, 42, 115-134.

Rothman, J.H., Yamashiro, C.T., Kane, P.M. and Stevens, T.H. (1989): Protein targeting to the yeast vacuole. *Trends. Biochem. Sci.*, 14, 347-349.

Rugolo, M., Dolly, J.O. and Nicholls, D.G. (1986): The mechanism of action of β -bungarotoxin at the presynaptic membrane. *Biochem. J.*, 223, 519-523.

Saito, N., Itouji, A., Totani, Y., Osawa, I., Koide, H., Fujisawa, K., Ogita, C. and Tanaka, C. (1993): Cellular and intracellular localization of e-subspecies of protein kinase C in rat brain; presynaptic localization of the e-subspecies. *Brain Res.*, 607, 241-247.

Sánchez-Prieto, J., Sihra, T.S. and Nicholls, D.G. (1987) a: Characterization of the exocytotic release of glutamate from guinea-pig synaptosomes. *J. Neurochem.*, 49, 58-64.

Sánchez-Prieto, J., Sihra, T.S., Aston, A., Evans, D., Dolly, J.O. and Nicholls, D.G. (1987) b: Botulinum toxin A and the inhibition of glutamate exocytosis from guinea-pig synaptosomes. *Eur. J. Biochem.*, 165, 675-681.

Sánchez-Prieto, J. and González, M.P. (1988): Anoxia induces a large Ca^{2+} -independent release of glutamate in isolated nerve terminals. *J. Neurochem.*, 50, 1322-1324.

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., De Laureto, P.P., DasGupta, B.R. and Montecucco C. (1992): Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 359, 832-835.

Schiebler, W., Jahn, R., Doucet, J-P., Rothlein, J. and Greengard, P. (1986): Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.*, 261, 8383-8390.

Schmalzing, G. (1985): Mechanism of depolarisation of rat cortical synaptosomes at sub-micromolar external calcium activity. *Biochem. J.*, 225, 671-680.

Schoepp, D.D. and Johnson, B.G. (1989): Inhibition of excitatory amino-acid-stimulated phosphoinositide hydrolysis in the neonatal rat hippocampus by 2-amino-3-phosphopropionate. *J. Neurochem.*, 53, 1865-1870.

Schoepp, D.D., Bockaert, J. and Sladeczek, F. (1990): Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 508-515.

- Schoepp, D.D., Johnson, B.G. and Conn, J.A.(1992): Inhibition of cyclic AMP formation by a selective metabotropic glutamate receptor agonist. *J. Neurochem.*, 58, 1184-1186.
- Schoepp, D.D. and Conn, P.J. (1993): Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.*, 14, 13-20.
- Scott, I.D. and Nicholls, D.G. (1980): Energy transduction in intact synaptosomes: influence of plasma membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. *Biochem. J.*, 186, 21-23.
- Shearman, M.S., Naor, Z., Kikkawa, U. and Nishizuka (1987): Differential expression of multiple protein kinase C subspecies in rat central nervous tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147, 911-919.
- Shearman, M.S., Shinomura, T., Oda, T. and Nishizuka, Y. (1991) a: Synaptosomal protein kinase C subspecies A. Dynamic changes in the hippocampus and cerebellar cortex concomitant with synaptogenesis. *J. Neurochem.*, 56, 1255-1262.
- Shearman, M.S., Shinomura, T., Oda, T. and Nishizuka, Y. (1991) b: Protein kinase C subspecies in adult rat hippocampal synaptosomes. Activation by diacylglycerol and arachidonic acid. *FEBS Lett.*, 279, 261-264.
- Sheu, F-S, Marais, R.M., Parker, P.J., Bazan, N.G. and Routtenberg, A. (1990): Neuron-specific protein F1/GAP 43 shows substrate specificity for the beta subtype of PKC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171, 1236-1243.
- Shimizu, T., Takusagawa, Y., Izumi, T., Ohishi, N. and Seyama, Y. (1987): Enzymic synthesis of leukotriene B₄ in the guinea pig brain. *J. Neurochem.*, 48, 1541-1546.
- Shimizu, T. and Wolfe, L.S. (1990): Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J. Neurochem.*, 55, 1-15.
- Shinomura, T., Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida, K. and Nishizuka, Y.(1991): Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5149-5153.
- Shu, C. and Selmánoff, M. (1988): Phorbol esters potentiate rapid dopamine release from median eminence and striatal synaptosomes. *Endocrinology*, 122, 2699-2709.
- Sihra, T.S. (1993): Glutamate release from isolated nerve terminals: modulatory role of protein phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.*, 21, 345-349.
- Simon, S.M. and Llinás, R.R. (1985): Compartmentalization of the submembrane calcium activity during influx and its significance in transmitter release. *Biophys. J.*, 48, 485-498.
- Sims, P.J., Waggoner, A.S., Wang, C.H. and Hoffman, J.F. (1974): Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potentials in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, 13, 3315-3330.

- Sladeczek, F., Pin, J-P, Recasens, M., Bockaert, J. and Weiss, S. (1985): Glutamate stimulated inositol phosphate formation in striatal neurons. *Nature*, 317, 717-719.
- Smith, C.U.M. (1989): *Elements of Molecular Neurobiology*. New York: Wiley.
- Smith, S.J. and Augustine, G.J. (1988): Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci.*, 11, 458-464.
- Snelling, R.M. and Nicholls, D.G. (1985): Calcium efflux and cycling across the synaptosomal plasma membrane. *Biochem. J.* 226, 225-231.
- Stone, T.W. (1991): Receptors for adenosine and adenine nucleotides. *Gen. Pharmacol.*, 22, 25-31.
- Storm-Mathisen, J. and Ottersen, O.P. (1987): Tracing of neurons with glutamate or GABA as putative neurotransmitters. *Biochem. Soc. Trans.*, 15, 200-212.
- Stratton, K. R., Worley, P.F. and Baraban, J.M. (1989): Excitation of hippocampal neurons by stimulation of glutamate Qp receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 173, 235-237.
- Stratton, K. R., Worley, P.F. and Baraban, J.M. (1990): Pharmacological characterization of phosphoinositide-linked glutamate receptor excitation of hippocampal neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 186, 357-361.
- Strong, J.A., Fox, A.P., Tsien, R.W. and Kaczmarck, L.K. (1987): Stimulation of protein kinase C recruits covert calcium channels in Aplysia bag cell neurons. *Nature*, 325, 714-717.
- Südhof, T.C. and Jahn, R. (1991): Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neurons*, 6, 665-677.
- Südhof, T.C., Czernik, A.J., Hung-Teh, K., Takei, K., Johnston, P.A., Hpriuchi, A., Kanazir, S.D., Wagner, M.A., Perin, M.S., De Camilli, P. and Greengard, P. (1989): Synapsins. Mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicles phosphoproteins. *Science*, 245, 1474-1480.
- Sugiyama, H., Ito, I. and Morono. C. (1987): A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipids metabolism. *Nature*, 325, 521-523.
- Swartz, K.T. and Bean, B.P. (1992): Inhibition of calcium channels in rat CA3 pyramidal neurons by a metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.*, 12, 4358-4371.
- Swartz, K.T., Merrit, A., Bean, B.P. and Lovinger, D.D. (1993): Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca^{2+} channels and synaptic transmission. *Nature*, 361, 165-168.
- Takai, Y., Kishimoto, A, Inoue, M. and Nishizuka, Y. (1977): Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 252, 7603-7609.
- Tanabe, Y., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R. and Nakanishi S. (1992): A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, 8, 169-179.

- Tanaka, C., Fujiwara, H. and Fujii, Y. (1986): Acetylcholine release from guinea pig caudate slices evoked by phorbol ester and calcium. *FEBS Lett.*, 195, 129-134.
- Terrian, D.M., Johnston, D., Claiborne, B.J., Ansah-Yiadom, R., Strittmatter, W.J. and Rea, M.A. (1988): Glutamate and dynorphin release from a subcellular fraction enriched in hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain Res. Bull.*, 21, 343-351.
- Terrian, D.M., Hernández, P.G., Rea, M.A. and Peters, R.I. (1989): ATP release, adenosine formation and modulation of dynorphin and glutamic acid release by adenosine analogues in rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *J. Neurochem.*, 53, 1390-1399.
- Terrian, D.M., Conner-Kerr, T.A., Privette, T.H. and Gannon, R.L. (1991): Domoic acid enhance the K⁺-evoked release of endogenous glutamate from guinea pig hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain Res.*, 551, 303-307.
- Terrian, D. M., Ways, D.K., Gannon, R.L. and Zetts, D.A. (1993): Transduction of a protein kinase C-generated signal into a long-lasting facilitation of glutamate release. *Hippocampus*, 3, 205-220.
- Thesleff, S. (1980): Aminopyridines and synaptic transmission. *Trends Neurosci.*, 5, 1413-1419.
- Thomas, L, Hartung, K., Lanosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, W.W. and Bezt H. (1988): Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science*, 242, 1050-1053.
- Thomsen, C., Kristensen, P., Mulvihill, E., Haldeman, B. and Suzdak, P.D. (1992): L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) is an agonist at the type IV metabotropic glutamate receptor which is negatively coupled to adenylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.*, 227, 361-362.
- Thureson-Klein, A.K. and Klein, R.L. (1990): Exocytosis from neuronal large dense-cored vesicles. *Int. Rev. Cytol.*, 121, 67-126.
- Tibbs, G.R., Barrie, A.P., Van Mieghe, F.J.E., McMahon, H.T. and Nicholls, D.G. (1989) a: Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca²⁺ and glutamate release. *J. Neurochem.*, 53, 1693-1699.
- Tibbs, G.R., Dolly, J.O. and Nicholls, D.G. (1989) b: Dendrotoxin, 4-aminopyridine, and β -bungarotoxin act at common loci but by two distinct mechanism to induce Ca²⁺-dependent release of glutamate from guinea-pig cerebrocortical synaptosomes. *J. Neurochem.*, 52, 201-206.
- Toggenburger, G., Felix, D., Cuenod, M. and Henke, H. (1982): In vitro release of endogenous beta-alanine, GABA and glutamate, and electrophysiological effect of beta-alanine in pigeon optic tectum. *J. Neurochem.*, 39, 176-183.
- Trimble, W.S.H. and Scheller, R.H. (1988): Molecular biology of synaptic vesicle-associated proteins. *Trends. Neurosci.*, 11, 241-242.
- Trombley, P.Q. and Westbrook (1992): L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein coupled glutamate receptor. *J. Neurosci.*, 12, 2043-

2048.

Turner, T.J., Adams, M.E. and Dunlap, K. (1992): Calcium channels coupled to glutamate release identified by w-Aga-IV A. *Science*, 258, 310-313.

Valtorta, F., Benfenati, F. and Greengard, P. (1992): Structure and function of the synapsins. *J. Biol. Chem.*, 267, 7195-7198.

Verhage, M., Besselsen, E., Lopes da Silva, F.H. and Ghijsen, W.E.J.M. (1989): Ca^{2+} -dependent regulation of presynaptic stimulus-secretion coupling. *J. Neurochem.*, 53, 1188-1194.

Volterra, A., Trotti, D., Cassutti, P., Tromba, C., Salvaggio, A., Melcangi, R.C. and Racagni, G. (1992): Free endogenous arachidonic acid levels regulate glutamate uptake in synaptosomes and astrocytes. *J. Neurochem.*, 59, 600-606.

Wang, J.K.T., Walaas, S.I., Shira, T.S., Aderem, A. and Greengard, P. (1989): Phosphorylation and associated translocation of the 87KD protein, a major protein kinase C substrate, in isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2253-2256.

Werz, M.A. and Macdonald, R.L. (1987): Dual actions of phorbol esters to decrease Ca^{2+} and K^{+} conductances of mouse neurones. *Neurosci. Lett.*, 78, 101-106.

Westbrook, G.L. and Mayer, M.L. (1987): Micromolar concentrations of Zn^{2+} antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature*, 328, 640-643.

Whittaker, V.P. (1984): The structure and function of cholinergic vesicles. *Biochem. Soc. Trans.*, 12, 561-576.

Williams, J.H., Errington, M.L., Lynch, M.A. and Bliss, T.V.P. (1989): Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature*, 341, 739-742.

Williams, K., Romano, C., Dichter, M.A. and Molinoff, P.B. (1991): Minireview: modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci.*, 48, 469-498.

Winter, D.W. and Conn, P.J. (1992): Activation of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus increases cyclic AMP accumulation. *J. Neurochem.*, 59, 375-378.

Wolf, M. and Baggiolini, M. (1988): The protein kinase inhibitor staurosporine, like phorbol esters, induces the association of protein kinase C with membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154, 1273-1279.

Yanagihara, N., Tachikawa, E., Izumi, F., Yasugawa, S., Yamamoto, H. and Miyamoto, E. (1991): Staurosporine: an effective inhibitor for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.*, 56, 294-298.

Yoshida, A., Ohno, C., Akira, O., Kuwahara, R., Ito, T. and Takahashi, M. (1992): HPC-1 is associated with synaptotagmin and w-conotoxin receptor. *J. Biol. Chem.*, 267, 24925-24928.

Young, A.B. and Fagg, G.E. (1990): Excitatory amino acid receptors in the brain:

membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 11, 126-133.

Yu, A.C.H., Chan, P.H. and Fishman R.A. (1987): Arachidonic acid inhibits uptake of glutamate and glutamine but not GABA in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res.*, 17, 424-427.

Yudkoff, M., Zaleska, M.M., Nissim, I., Nelson, D. and Erecinska, M. (1989): Neuronal glutamine utilization: pathways of nitrogen transfer studied with ¹⁵N glutamine. *J. Neurochem.*, 53, 632-640.

Zheng, F. and Gallagher, J.P. (1992): Metabotropic glutamate receptors are required for the induction of long-term potentiation. *Neuron*, 9, 163-172.

Zhu, P.C., Thureson-Klein, A. and Klein, R.L. (1986): Exocytosis from large dense cored vesicles outside the active synaptic zones of terminals within the trigeminal subnucleus caudalis: a possible mechanism for neuropeptide release. *Neurosci.*, 19, 43-54.

Zhuo, M., Small, S.A., Kandel, E.R. and Hawkins, P.D. (1993): Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science*, 260, 1946-1950.

Zoltay, G. and Cooper, J.R. (1990): Ionic basis of inhibitory presynaptic modulation in rat cortical synaptosomes. *J. Neurochem.*, 55, 1008-1012.

Presidentes:

Dr. Manuel Ruiz Arned

Vocales:

Dr. Manuel Lopez Perez

Dr. Juan Lerma Gomez

Dr. Federico Mayor Melendez

Secretario:

Dr. M. Teodoro Miras Portugal.

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal de

calificación de tesis para juzgar esta tesis doctoral

presentada por Unanimidad califican

do Apto cum Laude

Madrid, 24 de Marzo de 1974

El Secretario del Tribunal

M. T. Miras